

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE MEDICINA - FM

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

ELOISA SANCHES PEREIRA DO NASCIMENTO

**EFEITOS DE UM PROGRAMA DE EXERCÍCIO COMBINADO NA
FUNÇÃO PULMONAR E NA MORFOLOGIA DOS PULMÕES DE
RATOS COM SÍNDROME HEPATOPULMONAR**

BRASÍLIA

2022

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

FACULDADE DE MEDICINA - FM

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

**EFEITOS DE UM PROGRAMA DE EXERCÍCIO COMBINADO NA
FUNÇÃO PULMONAR E NA MORFOLOGIA DOS PULMÕES DE
RATOS COM SÍNDROME HEPATOPULMONAR**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. César Augusto Melo e Silva

Orientanda: Eloisa Sanches Pereira do Nascimento

BRASÍLIA

2022

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

NN244e Nascimento, Eloisa Sanches Pereira do
Efeitos de um programa de exercício combinado na função pulmonar e na morfologia dos pulmões de ratos com síndrome hepatopulmonar / Eloisa Sanches Pereira do Nascimento; orientador César Augusto Melo-Silva. -- Brasília, 2021.
83 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Médicas) -- Universidade de Brasília, 2021.

1. Mecânica respiratória. 2. Síndrome hepatopulmonar. 3. Exercício aeróbico. 4. Exercício de resistência. I. Melo Silva, César Augusto, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

À minha família, que sempre me apoiou em todos os momentos e decisões.

Ao meu companheiro João, pela compreensão e apoio.

Ao meu filho José, que me motiva a crescer diariamente.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tantas bênçãos e graças recebidas, e por sempre ser uma âncora na minha vida.

Ao meu orientador e amigo César Augusto, por todo conhecimento transmitido nestes anos, que foram muitos, pela compreensão, dedicação, paciência e competência com que me conduziu na elaboração e execução desta pesquisa.

À professora Dra. Veronica, sempre presente para auxiliar nas discussões, no desenvolvimento das ideias e na execução dos trabalhos.

Às professoras Daniela e Louise pelas valiosas contribuições no decorrer do projeto.

Aos amigos Suellen, Wagner e Eduardo que acompanharam toda a trajetória deste trabalho.

Ao senhor José (Dedé) que me auxiliou desde o começo do projeto no cuidado com os animais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de doutorado.

RESUMO

Introdução: O exercício físico atenua a inflamação pulmonar, no entanto, seus efeitos nas alterações do sistema respiratório causadas pela Síndrome hepatopulmonar (SHP) ainda não foram avaliados. **Objetivos:** Avaliar se a combinação de treinamento aeróbico e de resistência de moderada intensidade durante o desenvolvimento da síndrome hepatopulmonar (SHP) modifica a capacidade de exercício, a mecânica do sistema respiratório e as respostas à inflamação pulmonar e sistêmica. **Métodos:** Ratos Wistar foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: SHAM, SHP e SHP+EXER. Quinze dias após a indução da SHP foi realizado o protocolo de treinamento aeróbico e de resistência de moderada intensidade 5 vezes por semana durante 5 semanas em dias alternados. Foram avaliadas a capacidade de exercício, as propriedades mecânicas do sistema respiratório, a inflamação pulmonar e sistêmica, a morfologia pulmonar e a imuno-histoquímica. **Resultados:** O treinamento físico combinado aumentou de forma eficiente o tempo no teste máximo de corrida e a força máxima de animais com SHP, no entanto, não atenuou os distúrbios mecânicos respiratórios induzidos pela SHP ou a remodelação do tecido pulmonar. A SHP aumentou a concentração de IL-6 no lavado broncoalveolar, a concentração plasmática das citocinas INF- γ , TNF, IL-6 e IL-2, reduziu a expressão de IL-10 no epitélio das vias aéreas, aumentou a expressão de P2X7 e TFPI nos leucócitos do parênquima pulmonar, porém, não houve alteração com o exercício. **Conclusões:** O treinamento físico combinado pode levar a adaptações em ambas capacidades máxima de corrida e força máxima, mesmo não minimizando os desarranjos das propriedades mecânicas do sistema respiratório e a inflamação pulmonar e sistêmica causados pela SHP.

PALAVRAS-CHAVE: Mecânica respiratória, Síndrome hepatopulmonar, Exercício aeróbico, Exercício de resistência.

ABSTRACT

Introduction: Physical exercise training attenuates pulmonary inflammation, but its effects on impaired respiratory function caused by hepatopulmonary syndrome (HPS) have not been evaluated. **Objectives:** We determined if the combination of moderate intensity aerobic and resistance training during HPS development modifies exercise capacity, respiratory system mechanics, and lung inflammation responses. **Method:** Wistar rats were randomly divided into sham, HPS, and HPS + combined exercise training groups. Fifteen days after HPS induction, a moderate intensity aerobic plus resistance exercise training protocol was performed five times a week for 5 weeks on alternate days. Exercise capacity, respiratory system mechanics, lung inflammation, pulmonary morphology, and immunohistochemistry were evaluated. **Results:** Combined exercise training efficiently increased the maximal running and resistance capacity of HPS animals, however, it did not attenuate HPS-induced respiratory mechanical derangements or lung tissue remodeling. HPS increased the level of IL-6 in the bronchoalveolar lavage, the plasma level of INF- γ , TNF, IL-6 and IL-2, decreased the expression of IL-10 in the airway epithelium, increased the expression of P2X7 and TFPI in lung parenchymal leukocytes, however, there was no change with the exercise. **Conclusions:** Combined exercise training can elicit adaptation with regard to both maximal running capacity and maximum strength even without mitigating the respiratory system mechanical derangements induced by HPS and without reduce the pulmonary and systemic inflammation.

KEYWORDS: Respiratory mechanics, Hepatopulmonary syndrome, Aerobic exercise, Resistance exercise.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	- Representação de uma unidade de troca gasosa	14
Figura 1.2	- Representação esquemática da patogênese da SHP em modelo experimental	16
Figura 1.3	- Representação das principais alterações observadas em pacientes cirróticos que podem induzir a sarcopenia	20
Figura 3.1	- Fluxograma do experimento	33
Figura 3.2	- Representação esquemática do sistema respiratório por meio de balão e tubo	36
Figura 3.3	- Sistema teste coerente e de referência.	42
Figura 4.1	- Peso inicial e final dos animais	45
Figura 4.2	- Teste máximo de corrida em tempo	46
Figura 4.3	- Representação gráfica da diferença de força máxima final e inicial, em porcentagem de peso corporal.	47
Figura 4.4	- Representação gráfica das citocinas no lavado broncoalveolar.	49
Figura 4.5	- Representação gráfica da contagem diferencial de células	50
Figura 4.6	- Representação gráfica das citocinas no plasma	51
Figura 4.7	- Fotomicrografia da via aérea e do parênquima hepático	53
Figura 4.8	- Representação gráfica da expressão do P2X7	55
Figura 4.9	- Fotomicrografia da expressão de P2X7	56
Figura 4.10	- Representação gráfica da expressão do TFPI	57
Figura 4.11	- Fotomicrografia da expressão de TFPI	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	- Prescrição da carga do treinamento resistido	34
Tabela 4.1	- Teste de carga máxima (% peso corporal)	47
Tabela 4.2	- Propriedades mecânicas do sistema respiratório	48
Tabela 4.3	- Volume percentual de fibras colágenas (%)	52
Tabela 4.4	- Expressão da IL-10 no epitélio das vias aéreas, parênquima pulmonar e fígado	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	-	Adenosina-trifosfato
CO	-	Monóxido de carbono
D(A-a)O ₂	-	Diferença alvéolo-arterial de oxigênio
ΔP	-	Diferença de pressão
DPOC	-	Doença pulmonar obstrutiva crônica
E	-	Elastância
eNOS	-	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
ET-1	-	Endotelina 1
ET-B	-	Endotelina B
f	-	Frequência
G	-	Energia dissipada dentro do tecido
H	-	Energia armazenada nos tecidos
I	-	Inertância
IL-1	-	Interleucina - 1
IL-10	-	Interleucina – 10
IL-18	-	Interleucina – 18
IL-2	-	Interleucina – 2
IL-4	-	Interleucina – 4
IL-6	-	Interleucina – 6
IL-8	-	Interleucina – 8
INF- γ	-	Interferon – γ
iNOS	-	Enzima óxido nítrico sintase induzível
LBA	-	Lavado broncoalveolar
LDBC	-	Ligadura do ducto biliar comum
MERD score	-	Model for End-Stage Liver Disease
NO	-	Óxido nítrico
P2X7	-	Receptor P2X7
PaO ₂	-	Pressão arterial parcial de oxigênio
PCR	-	Proteína C reativa
Pel	-	Pressão de recolhimento elástico

R	- Resistência
RM	- Repetição máxima
Rn	- Resistência Newtoniana
SHP	- Síndrome hepatopulmonar
SR	- Sistema respiratório
t	- Tempo
TFPI	- Inibidor do fator tecidual
TMC	- Teste máximo de corrido
TNF	- Fator de necrose tumoral
TOF	- Técnica de oscilação forçada
V	- Volume
\dot{V}/Q	- Relação ventilação/perfusão
\dot{V}	- Fluxo
VEGF-A	- Fator de crescimento endotelial vascular – A
Velmáx	- Velocidade máxima
Z	- Impedância

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
1.1	CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA	12
1.2	FISIOPATOLOGIA	14
1.2.1	Alterações musculares decorrentes de doença hepática	18
1.3	TRATAMENTO	21
1.4	EXERCÍCIO FÍSICO	23
1.5	JUSTIFICATIVA	26
2.	OBJETIVOS	29
3.	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	DELINEAMENTO DE PESQUISA E CÁLCULO AMOSTRAL	30
3.2	MODELO ANIMAL E GRUPOS EXPERIMENTAIS	30
3.3	TESTES FÍSICOS	31
3.3.1	Teste máximo de corrida	31
3.3.2	Teste de carga máxima	32
3.4	PROTOCOLO DE TREINAMENTO	33
3.4.1	Treinamento aeróbico	33
3.4.2	Treinamento resistido	34
3.5	AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS DO SISTEMA RESPIRATÓRIO	35
3.5.1	Avaliação da resistência e elastância do sistema respiratório	35
3.5.2	Avaliação da impedância do sistema respiratório	37
3.6	AVALIAÇÃO INFLAMATÓRIA PULMONAR E SISTÊMICA	40
3.7	AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DO TECIDO PULMONAR	41
3.8	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO FÍGADO	42
3.9	IMUNO-HISTOQUÍMICA	43
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4.	RESULTADOS	45
4.1	PESO DOS ANIMAIS	45
4.2	CAPACIDADE MÁXIMA DE EXERCÍCIO	46
4.3	TESTE DE FORÇA MÁXIMA	47
4.4	PROPRIEDADES MECÂNICAS DO SISTEMA RESPIRATÓRIO	48
4.5	INFLAMAÇÃO PULMONAR	48
4.6	INFLAMAÇÃO SISTÊMICA	50
4.7	ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO TECIDO PULMONAR E HEPÁTICO	51
4.8	IMUNO-HISTOQUÍMICA	53

5.	DISCUSSÃO.....	59
6.	CONCLUSÃO.....	66
7.	REFERÊNCIAS.....	67

1.INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

A síndrome hepatopulmonar (SHP) é definida na presença de doença hepática crônica ou hipertensão portal e vasodilatação pulmonar que aumentam o gradiente alvéolo-arterial de oxigênio, podendo acometer pacientes em todas as idades. (KOCH et al., 2014; RODRIGUEZ-ROISIN et al., 2008; ZHANG et al., 2012).

Os critérios diagnósticos para SHP incluem confirmação da hipoxemia e da vasodilatação pulmonar na presença de doença hepática crônica (KOCH et al., 2014). A hipoxemia arterial (pressão arterial parcial de oxigênio - $PaO_2 < 80$ mmHg) é verificada avaliando-se a PaO_2 obtida com o paciente sentado em repouso e respirando em ar ambiente. O cálculo da diferença alvéolo-arterial de oxigênio ($D(A-a)O_2$) é mais fidedigno para detectar, precocemente, a hipoxemia arterial, pois pode identificar desoxigenação arterial antes que a PaO_2 diminua para níveis considerados clinicamente significantes ($PaO_2 < 80$ mmHg). Em ar ambiente e ao nível do mar, a $D(A-a)O_2$ acima de 15 mmHg é considerada anormal ou acima de 20 mmHg para indivíduos com mais de 64 anos (RODRÍGUEZ-ROISIN et al., 2008; ZHANG et al., 2012).

A classificação da gravidade da SHP é estabelecida de acordo com o grau da hipoxemia e é dividida em quatro estágios: leve ($PaO_2 \geq 80$ mmHg), moderada ($60 \leq PaO_2 < 80$ mmHg), grave ($50 \leq PaO_2 < 60$ mmHg) e muito grave ($PaO_2 < 50$ mmHg) (RODRÍGUEZ-ROISIN et al., 2004).

O ecocardiograma transtorácico com contraste é a técnica mais sensível e mais frequentemente usada para detectar a dilatação vascular intrapulmonar, que pode ser

local ou difusa, e menos comumente, pode haver comunicação arteriovenosa pleural e pulmonar. (NACIF et al., 2014; RODRIGUEZ-ROISIN et al., 2008; ZHANG et al., 2012).

A prevalência da SHP varia de 4 a 41,5% nos pacientes com cirrose hepática (KOCH et al., 2014; ZHANG et al; 2012; SUK et al., 2018; PASCASIO et al., 2014; SCHENK et al., 2002), e esta amplitude de variação deve-se aos diferentes critérios diagnósticos empregados pelos investigadores. Embora alguns estudos afirmem que a SHP é mais comum em pacientes com hepatopatias avançadas e nos pacientes que apresentam hipertensão portal grave, ela ocorre, claramente, em ambos os pacientes com doença hepática, compensados e descompensados (ZHANG et al; 2012).

A sobrevida média de pacientes cirróticos com SHP em 5 anos é de 23%, enquanto que a sobrevida média de pacientes cirróticos sem SHP é de 63% em 5 anos. Ademais, a sobrevida a longo termo para os pacientes com SHP é menor para aqueles com $PaO_2 < 60$ mmHg (SWANSON et al; 2005).

Em pacientes cirróticos, o estado nutricional é um fator importante que está associado à mortalidade e morbidade. A desnutrição está presente 59% dos pacientes cirróticos e apresenta correlação significativa com a gravidade da doença avaliada pelo “*Child-Pugh score*” (MAHARSHI et al., 2015). A mortalidade de pacientes cirróticos é maior para aqueles que apresentam desnutrição comparada aos que apresentam estado nutricional normal (41% e 18%, respectivamente, em 12 meses), de acordo com estudo de Maharshi et al. (2015).

1.2 FISIOPATOLOGIA

A principal característica da SHP é a vasodilatação microvascular e a angiogênese pulmonar (FIGURA 1.1). De acordo com Koch et al. (2014), Rodriguez-Roisin et al. (2008) e Zhang et al. (2012), a vasodilatação pulmonar decorre do excesso na produção de agentes vasodilatadores, como o óxido nítrico (NO) e o monóxido de carbono (CO). O aumento da concentração de NO é devido, principalmente, a maior concentração da enzima óxido nítrico sintase endotelial pulmonar ([eNOS]), e esta, por sua vez, decorre do aumento na produção e liberação hepática de endotelina – 1 (ET-1). Em pacientes cirróticos, os níveis plasmáticos de ET-1 e NO são aumentados (SUK et al., 2017), assim como a expressão de receptores de endotelina – B (ET-B) no endotélio vascular pulmonar. Logo, a ET-1 produzida pela lesão hepática ativa os receptores pulmonares de ET-B, resultando em vasodilatação mediada pelo NO, via eNOS.

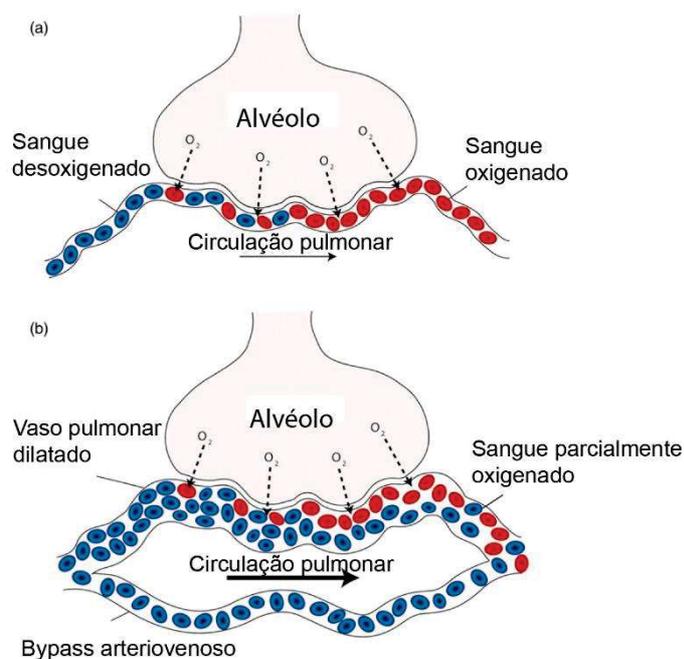


Figura 1.1 – a) Representação de uma unidade de troca gasosa normal, com o alvéolo e a circulação pulmonar normais. b) Representação de uma unidade de troca gasosa na SHP, onde a vasodilatação

pulmonar e a angiogênese resultam em incompleta oxigenação do sangue. Adaptada de Grace et al., 2013.

O aumento na produção pulmonar de CO encontrado nos modelos experimentais de SHP é derivado dos macrófagos intravasculares que se acumulam, progressivamente, após a ligadura do ducto biliar comum. O CO é, primariamente, produzido pela degradação da heme oxigenase (GRACE et al., 2013; ZHANG et al., 2012).

Os macrófagos também contribuem para a vasodilatação pulmonar por aumentarem os níveis de NO via óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A aderência vascular dos macrófagos é regulada através da ET-1 e da ativação dos receptores de ET-B, que elevam os níveis de quimiocinas. O acúmulo de macrófagos no pulmão ocorre, provavelmente, devido à presença de fator de necrose tumoral (TNF) na circulação como resposta inflamatória à translocação bacteriana, ao aumento de ET-1 e às quimiocinas que atraem monócitos (KOCH et al., 2014; RODRIGUEZ-ROISIN et al., 2008; ZHANG et al., 2012).

Além da dilatação vascular pulmonar, a angiogênese também é observada pela maior densidade capilar pulmonar e pela ativação do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A). A principal fonte secretora de VEGF-A é a adesão vascular dos monócitos. (GRACE et al., 2013; KOCH et al., 2014; ZHANG et al., 2012).

Devido à diminuição da capacidade fagocitária do fígado doente, os pulmões, em compensação, fazem a limpeza das bactérias e toxinas da circulação sanguínea. Como consequência, as células mononucleares do sangue se acumulam no endotélio vascular pulmonar e se diferenciam em macrófagos, que ampliam sua função fagocitária para remover as toxinas e bactérias do sangue. Após a ativação dos macrófagos, NO, CO, TNF- α , interleucina - 1 (IL-1), interleucina – 6 (IL-6), interleucina – 8 (IL-8) e outros mediadores inflamatórios são secretados e desempenham

importante papel no desenvolvimento da SHP (ZHANG et al., 2010), como ilustrado na figura 1.2.

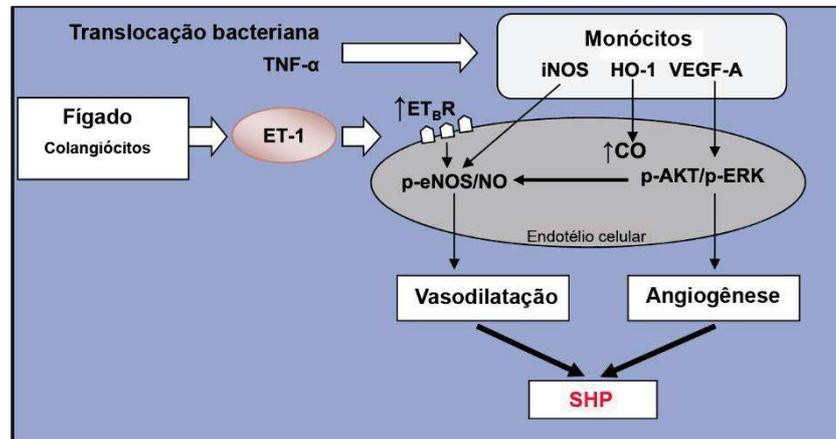


Figura 1.2 – Representação esquemática da patogênese da SHP em modelo experimental, onde a maior produção de endotelina – 1 (ET-1) pelo fígado e a translocação bacteriana desencadeiam alterações no endotélio vascular pulmonar que resultam em vasodilatação e angiogênese. TNF- α : fator de necrose tumoral – α ; ET_BR: receptor de endotelina B; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; HO-1: heme oxigenase -1; VEGF-A: fator de crescimento endotelial vascular – A; CO: monóxido de carbono; NO: óxido nítrico; p-eNOS: óxido nítrico sintase endotelial fosforilada; p-AKT/P-ERK: via proteína quinase fosforilada/quinase regulada por sinal extracelular; SHP: síndrome hepatopulmonar. Adaptada de Koch et al., 2014.

Além das alterações vasculares pulmonares, alterações das propriedades mecânicas do sistema respiratório e na morfologia do tecido pulmonar também são observadas. Aumento na impedância da parede torácica, da energia dissipada contra as propriedades viscoelásticas pulmonares e elastância pulmonar, remodelamento vascular e de via aérea com aumento no depósito de colágeno e fibras elásticas nos brônquios e vasos e edema perivascular são observados em ratos submetidos à ligadura do ducto biliar comum (MELO-SILVA et al., 2011).

Ademais, cabe ressaltar que alterações hemodinâmicas *per se* também influenciam a estabilidade mecânica do parênquima pulmonar e, conseqüentemente, as propriedades mecânicas do sistema respiratório. A manutenção da pressão capilar pulmonar fisiológica contribui significativamente para manter a estabilidade da arquitetura alveolar (PETÁK et al., 2004; ALBU et al., 2007). Gibney et al. (2017)

demonstraram em estudo experimental, que após ressecção pulmonar e aumento na perfusão do pulmão remanescente, houve aumento na impedância do parênquima pulmonar, tanto na resistência quanto na elastância do tecido pulmonar.

Além disso, as modificações mecânicas pulmonares induzidas pela SHP não se restringem, unicamente, aos fatores hemodinâmicas e o remodelamento do tecido pulmonar. Em ratos com SHP, Yang et al. (2014) encontraram redução nos níveis das proteínas surfactantes pulmonares, acompanhada de apoptose dos pneumócitos tipo II e diminuição do espaço aéreo alveolar, o que corrobora com a redução do volume corrente demonstrada por MELO-SILVA et al. (2011). Uma maior restrição na função pulmonar de pacientes com SHP comparado a pacientes sem SHP corrobora com o menor espaço aéreo alveolar observado em estudo experimental.

Diante de todas as alterações descritas, é razoável supor que o distúrbio na relação ventilação/perfusão (\dot{V}/Q) presente na SHP não decorra, somente, da vasodilatação e da angiogênese (RAEVENS; FALLON, 2018). De acordo com este modelo, a relação \dot{V}/Q diminui de forma homogênea como consequência do aumento da perfusão com manutenção da ventilação. No entanto, os resultados dos trabalhos de Melo-Silva et al. (2011) e Yang et al. (2014), demonstraram, experimentalmente, que além das alterações vasculares supracitadas, há outros fatores pulmonares e extrapulmonares que contribuem para a formação de baixa relação \dot{V}/Q vista em ratos com SHP.

Diante de todas as alterações descritas anteriormente, os possíveis mecanismos que alteram a relação \dot{V}/Q e, conseqüentemente, deterioram as trocas gasosas, são: (i) maior fluxo sanguíneo pulmonar, (ii) redução da ventilação minuto, (iii) aumento da elastância pulmonar, (iv) remodelamento do tecido pulmonar, (v) redução do volume corrente e da taxa média de fluxo inspiratório (MELO-SILVA et al., 2011).

1.2.1 Alterações musculares decorrentes de doença hepática

A diminuição de massa e da força muscular, ou sarcopenia, é uma característica clínica frequente em pacientes cirróticos e está associada a maior morbidade e mortalidade desta população (SINCLAIR et al., 2016). Sua prevalência atinge 48% dos pacientes cirróticos e está associada à menor sobrevida, independentemente de outros fatores de risco, tais como idade e MELD “score” (“*Model for End-Stage Liver Disease*”) (KIM, et al., 2017). Além disso, a sarcopenia também está associada com maior tempo de hospitalização e maior incidência de infecção bacteriana após o transplante hepático (MONTANO-LOZA et al., 2014).

A etiologia da sarcopenia é multifatorial, no entanto, o papel de cada fator é pouco elucidado. A manutenção da massa muscular em indivíduos saudáveis resulta do equilíbrio entre a formação e a degradação do tecido muscular, o que não é encontrado nos pacientes cirróticos, onde tanto a formação quanto a degradação estão alterados (SINCLAIR et al., 2016).

A desnutrição ou subnutrição reduz os substratos necessários para formação muscular e acredita-se ter um importante papel no desenvolvimento da sarcopenia nos pacientes cirróticos. Existem diferentes causas que reduzem a ingestão calórica nestes pacientes incluindo náuseas, anorexia, ascite, alteração da motilidade intestinal e percepção alterada de sabor. Além da alteração na ingestão calórica, a absorção dos nutrientes também se encontra alterada (DUARTE-ROJO et al., 2018).

Os distúrbios metabólicos encontrados em pacientes cirróticos vão além de desnutrição e má absorção de nutrientes. A oxidação de ácidos graxos e proteínas para produção de energia ocorre mais precocemente quando comparado a indivíduos saudáveis, e esta mudança na fonte produtora de energia pode ocorrer devido à

redução na capacidade de armazenamento hepático de glicogênio (DUARTE-ROJO et al., 2018; SINCLAIR et al., 2016).

A miostatina é uma citocina produzida e liberada pela célula muscular e que regula, negativamente, a síntese proteica, logo, inibe o crescimento muscular. Pacientes cirróticos apresentam níveis basais elevados de miostatina que estão associados à pior sobrevida. Níveis elevados de miostatina em pacientes cirróticos exercem importante papel no desenvolvimento da sarcopenia. No entanto, a causa desta elevação não é totalmente clara. Um possível mecanismo é a elevação dos níveis de amônia que, por sua vez, aumentam a expressão de miostatina (NISHIKAWA, et al., 2017; SINCLAIR et al., 2016).

Outra via que leva à degradação muscular é a ubiquitina-proteassoma. Esta via também se encontra alterada em cirróticos. O provável mecanismo de estimulação desta via é o aumento de mediadores inflamatórios no sangue e no tecido muscular, pois existe uma correlação positiva entre o TNF- α muscular e a ubiquitina. Sendo a cirrose uma doença pró-inflamatória, o aumento nos níveis circulantes de mediadores inflamatórios também é um fator causal de sarcopenia (LIN et al., 2005). A figura 1.3 ilustra as diversas vias que induzem a sarcopenia.

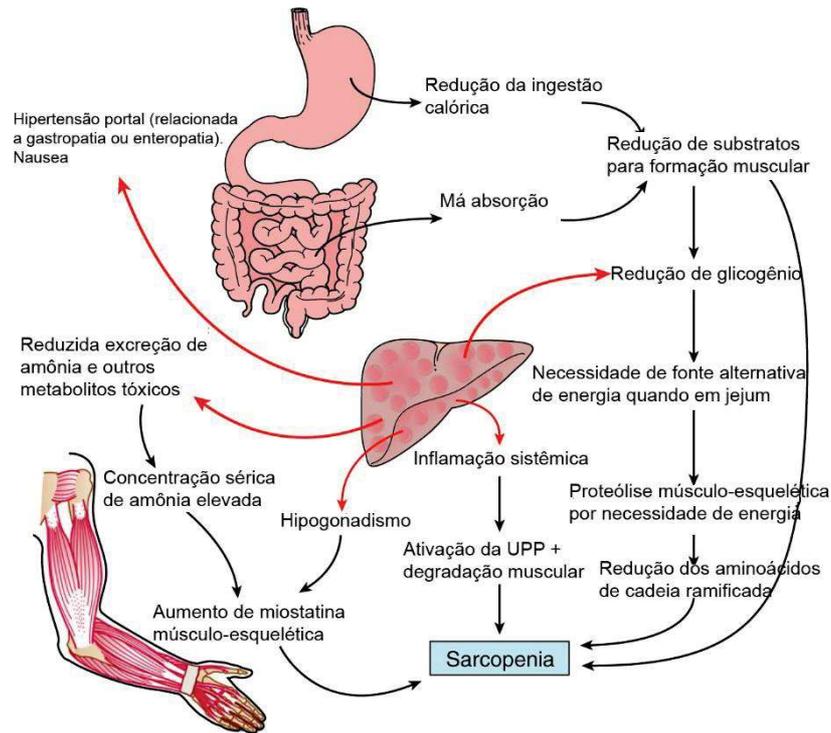


Figura 1.3 – Representação das principais alterações observadas em pacientes cirróticos que podem induzir a sarcopenia. Adaptada de Sinclair et al., 2016. UPP: via ubiquitina-proteassoma.

Visto que a sarcopenia é uma complicação clínica frequente em cirróticos e que está estritamente relacionada com pior prognóstico e pior qualidade de vida, terapias que visem minimizar essas alterações musculares devem ser implementadas, tais como aumento da ingestão calórica e exercício físico, com o objetivo de otimizar a função muscular e melhorar a qualidade de vida.

A combinação de exercícios aeróbicos e resistido de moderada intensidade, associado à adequada ingestão calórica, é recomendado para pacientes com doença hepática em estágio avançado, sem existir contraindicações para sua realização. O treinamento aeróbico melhora o condicionamento cardiorrespiratório, enquanto o treinamento resistido é capaz de melhorar a força muscular, o equilíbrio e a densidade mineral óssea, além de outros benefícios como melhora da qualidade de vida, deambulação e independência funcional (DUARTE-ROJO et al., 2018).

Aproximadamente 1 em cada 5 pacientes com doença hepática em estágio final que estão na lista de espera para transplante hepático evoluem a óbito ou com progressão da doença a cada ano (KIM et al., 2015), sendo necessárias, portanto, intervenções que possam sustentar os pacientes na espera pelo transplante. O exercício é uma alternativa viável, segura, efetiva e acessível para ajudar os pacientes a se manterem menos vulneráveis às complicações enquanto aguardam o transplante (DUARTE-ROJO et al., 2018).

1.3 TRATAMENTO

Nenhum tratamento medicamentoso efetivo está estabelecido para tratar os pacientes com SHP. Diferentes tipos de medicamentos já foram estudados, como, por exemplo, alguns antibióticos, porém, na maioria dos estudos clínicos, o número de pacientes estudados é pequeno e os resultados são controversos. A norfloxacina, um antibiótico que age contra bactérias gram-negativas, é utilizada com o objetivo de prevenir a translocação bacteriana e, conseqüentemente, diminuir o acúmulo de macrófagos no leito vascular pulmonar. Em estudo com animais, o uso profilático de norfloxacina diminuiu a translocação bacteriana, o acúmulo de macrófagos no leito vascular pulmonar, a expressão de iNOS no pulmão e a gravidade da SHP (RABILLER et al., 2002). Assim como o tratamento profilático com levofloxacina preveniu a elevação da impedância da parede torácica e reduziu a heterogeneidade observada na SHP e o remodelamento vascular pulmonar e da via aérea (GAIO et al., 2013). No entanto, os mesmos resultados não foram encontrados em estudo clínico. Gupta et al.

(2010) não encontrou nenhuma melhora na oxigenação, no NO exalado e na capacidade funcional de pacientes com SHP tratados com norfloxacin.

A pentoxifilina, um inibidor de fosfodiesterase não específico, também tem sido utilizada com o objetivo de inibir a produção de TNF e, conseqüentemente, diminuir a produção de NO e a angiogênese (ESHRAGHIAN et al., 2013). Em estudo com animais, os resultados são positivos, com melhora da troca gasosa e da vasodilatação pulmonar, diminuição da ativação das enzimas óxido nítrico sintase, dos receptores de endotelina-B, do acúmulo intravascular de macrófagos e da angiogênese (ZHANG et al., 2007; ZHANG et al., 2009). Embora muitos benefícios tenham sido relatados nos estudos com animais, em humanos eles não se confirmam. Um estudo clínico com 9 pacientes adultos com SHP incluídos na lista de espera para transplante não encontrou melhora na oxigenação após 8 semanas de tratamento com pentoxifilina, sendo que a tolerância dos pacientes para a dose recomendada de tratamento foi baixa (TANIKELLA et al., 2008). No entanto, os resultados foram diferentes quando o tratamento foi aplicado em crianças, que apresentaram melhora na oxigenação arterial após 3 meses de tratamento, porém, os benefícios não se mantiveram com a sua descontinuidade (KIANIFAR et al., 2012).

O azul de metileno tem sido utilizado no tratamento de pacientes com SHP por sua ação vasoconstritora, ou seja, ele inibe a vasodilatação induzida pelo NO. Os estudos experimentais e clínicos mostram resultados satisfatórios com aplicação do azul de metileno, na pressão arterial de oxigênio, na diferença alvéolo-arterial de oxigênio e na angiogênese (MIYAMOTO et al., 2010; SCHENK et al., 2000). Porém, os estudos clínicos não são randomizados e não incluem grupo placebo.

O alho é uma planta rotineiramente utilizada na alimentação, que tem sido empregada no tratamento de pacientes com SHP. Contudo, o seu mecanismo de ação

ainda é desconhecido. Estudos clínicos utilizando óleo de alho em cápsulas observaram aumento na pressão arterial de oxigênio e redução da diferença alvéolo-arterial de oxigênio (DE et al., 2010; SANI et al., 2006).

Entretanto, clinicamente, o único tratamento capaz de reverter a hipoxemia presente nos pacientes com SHP é o transplante hepático. Devido à alta mortalidade dos pacientes com SHP que não realizaram o transplante hepático e a progressiva piora da hipoxemia (SWANSON et al; 2005), foi atribuído a estes uma pontuação extra na escala de gravidade (MELD score), assegurando-lhes prioridade na lista de espera e, dessa forma, minimizando o tempo de espera (FREEMAN et al., 2006).

Muito embora a sobrevida possa ser menor em pacientes com SHP pré-transplante, parece não existir diferença na sobrevida pós-transplante entre pacientes com e sem SHP, sendo a mortalidade pós-transplante para pacientes com SHP de 22% em 18 meses. A reversibilidade da SHP avaliada em 6 meses pós transplante é de 96% e em 1 ano é de 100%, levando em consideração para avaliação da reversibilidade, os mesmos critérios utilizados para diagnóstico, hipoxemia e dilatação vascular pulmonar (PASCASIO et al., 2014).

1.4 EXERCÍCIO FÍSICO

Recente revisão sistemática (PEDERSEN; SALTIN, 2015) confirma que o exercício físico pode ser realizado por muitos pacientes com doenças crônicas, tais como doenças cardíacas, pulmonares, psiquiátricas, osteomusculares e oncológicas, como um medicamento, sozinho ou associado a outros tratamentos. Na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), por exemplo, o exercício físico é parte integral

do tratamento clínico e os pacientes apresentam melhora significativa na qualidade de vida, na capacidade máxima de exercício, na capacidade funcional, na sensação de dispneia e, também, vivenciam menos hospitalizações.

De acordo com Pedersen e Saltin (2015), pacientes com DPOC apresentam níveis elevados de TNF no sangue e no tecido muscular, que estão associados a diminuição de força muscular. O exercício físico consegue diminuir os níveis de TNF e combater o aumento da degradação proteica observada em pacientes com DPOC. Para pacientes com pneumopatia crônica, o treinamento combinado, aeróbico e resistido, de moderada intensidade, promove os melhores resultados.

O efeito anti-inflamatório do exercício físico pode ser observado a nível local, nos pulmões, como descrito por Silva et al. (2010) que encontraram reversão da inflamação e do remodelamento das vias aéreas e também redução da resistência e elastância do tecido pulmonar, além de aumento na expressão de citocinas anti-inflamatórias como interleucina – 10 (IL-10) e interleucina – 1ra (IL-1ra) em ratos asmáticos que foram submetidos a exercício aeróbico por 4 semanas, 5 vezes por semana, a 50% da capacidade máxima de exercício.

Olivo et al. (2014) observaram que o exercício aeróbico (50% da capacidade máxima de exercício) conseguiu diminuir a quantidade de bactéria nos pulmões e atenuou o processo inflamatório pulmonar em animais infectados com *Streptococcus pneumoniae*, sendo que, o efeito do condicionamento físico na inflamação pulmonar foi observado na fase aguda (12 horas) e tardia (10 dias) da infecção. Segundo os autores, este efeito anti-inflamatório do exercício físico pode ser decorrente do efeito antioxidante do condicionamento físico.

O mesmo efeito protetor do exercício aeróbico foi observado por Reis Gonçalves et al. (2012). Neste trabalho, os animais realizaram 5 semanas de exercício aeróbico,

3 vezes por semana, a 50% da capacidade máxima de exercício, previamente a indução da lesão pulmonar aguda por instilação intratraqueal de lipopolissacarídeo. E o grupo que realizou o treinamento apresentou menor resistência e elastância do sistema respiratório, menor concentração de NO e expressão de TNF- α no tecido pulmonar.

O efeito anti-inflamatório sistêmico do exercício físico foi observado por Jorge et al. (2011) em pacientes com diabetes Mellitus tipo 2. Os pacientes foram divididos em 4 grupos: controle, exercício aeróbico, exercício resistido e exercício combinado, sendo que nos 3 grupos que realizaram treinamento por 12 semanas, foi observado diminuição nos níveis séricos de proteína C-reativa (PCR), além de benefícios na glicemia, no perfil lipídico e na pressão sanguínea. Nascimento et al. (2015) e Abd El-Kader et al. (2015) também observaram redução nos níveis plasmáticos de mediadores inflamatórios como IL-8, IL-6 e TNF- α após programa de exercício aeróbico em pacientes com doença inflamatória crônica, como DPOC, diabetes Mellitus tipo 2 e obesidade.

O treinamento resistido, assim como o treinamento aeróbico, aplicado em pacientes com doença crônicas, apresenta efeito benéfico, no que diz respeito a ação anti-inflamatória do condicionamento físico, como observado por Martins et al. (2015), Liu et al. (2015) e Jorge et al. (2011), com redução dos níveis plasmáticos de TNF- α , IL-6, IL-18 e PCR. No entanto, o treinamento resistido também aumenta a força muscular, comumente diminuída em pacientes com doenças crônicas, como observado por Alves et al. (2014) em modelo experimental de insuficiência cardíaca que realizaram o treinamento em aparelho adaptado para esta finalidade, 4 vezes por semana, por 8 semanas, 4 séries de 10-12/repetições, de 65% a 75% de 1 repetição máxima.

Em pacientes com DPOC, o treinamento resistido aumentou a força muscular do quadríceps e a área de secção transversa de fibras tipo II, após 8 semanas de treinamento, assim como, diminui a infiltração de células inflamatórias no tecido muscular, como observado por Menon et al. (2012).

Além disso, há uma correlação inversa entre mediadores inflamatórios (TNF- α e PCR) e a espessura muscular, sugerindo que a hipertrofia muscular induzida pelo treinamento resistido está associada com a redução nos níveis plasmáticos dos mediadores inflamatórios (OGAWA et al., 2010).

Os pacientes com SHP apresentam, como consequência das alterações primárias da doença, menor capacidade de exercício, com menor consumo máximo de oxigênio, menor capacidade funcional, menor força muscular respiratória e pior qualidade de vida comparado a pacientes cirróticos sem SHP (FAUSTINI-PEREIRA et al., 2015; FALLON et al., 2008).

De acordo com o que foi descrito anteriormente e considerando a SHP como uma doença crônica, os pacientes com SHP poderiam se beneficiar do efeito anti-inflamatório do exercício físico e de seus demais benefícios, como aumento da força muscular, melhora da capacidade funcional e da qualidade de vida, minimizando/revertendo as alterações decorrentes da SHP.

1.5 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos há um grande interesse em desenvolver tratamentos que possam minimizar ou reverter os efeitos da SHP, tendo em vista as altas taxas de mortalidade, os problemas sociais decorrentes desta doença e o alto custo no manejo

dos pacientes. É importante ressaltar que esta doença apresenta um prognóstico ruim quando não realizado o transplante hepático. Vários tipos de antibióticos são estudados, alguns resultados satisfatórios foram encontrados na área experimental (GAIO et al., 2013; CHANG et al., 2015), porém, em ensaios clínicos, nenhuma diferença significativa foi observada, permanecendo a ineficiência do tratamento medicamentoso (ESHRAGHIAN et al., 2013).

Somado ao fato que a SHP possa ainda ser uma doença subdiagnosticada, ao prognóstico reservado e ao comprometimento da qualidade de vida destes doentes, o estudo de novas linhas de tratamentos é de extrema importância para tratar e melhorar a qualidade de vida dos pacientes enquanto eles permanecem na fila de espera do transplante hepático que, atualmente, é o único tratamento efetivo (COSARDERELIOGLU et al., 2016).

Como descrito anteriormente, o treinamento físico, com exercício aeróbico e resistido, possui efeito anti-inflamatório local e sistêmico, atenua os distúrbios mecânicos do sistema respiratório e o remodelamento do tecido pulmonar induzidos pela asma (SILVA et al., 2010; SILVA et al., 2016) e pela lesão pulmonar aguda (REIS GONÇALVES et al., 2012), bem como melhora a capacidade de exercício, a força muscular e a qualidade de vida, aspectos importantes que estão comprometidos nos pacientes com SHP.

Justifica-se, então, a realização deste estudo com o propósito de estudar os efeitos do exercício combinado em ratos com SHP como uma nova alternativa no tratamento dos pacientes acometidos por esta síndrome. Considerando a hipótese de que o exercício pode influenciar no desenvolvimento da SHP através do bloqueio da via inflamatória, que se apresenta pela maior produção de TNF, e, conseqüentemente,

minimizando os efeitos decorrentes do acúmulo de células inflamatórias na vasculatura pulmonar.

2. OBJETIVOS

• Geral: avaliar os efeitos do exercício combinado (aeróbico e resistido) de moderada intensidade no sistema respiratório em ratos com SHP.

• Específicos:

- Estudar as propriedades mecânicas do sistema respiratório.
- Estudar a morfologia do tecido pulmonar.
- Estudar os mediadores inflamatórios pulmonar e sistêmico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA E CÁLCULO AMOSTRAL

Estudo experimental e prospectivo, realizado no Laboratório de Fisiologia Respiratória da Faculdade de Medicina - FM da Universidade de Brasília.

Para o cálculo do tamanho amostral utilizamos os seguintes parâmetros: (i) análise de variância de uma via e de duas caudas; (ii) três grupos; (iii) erro do tipo I de 5%; (iv) erro do tipo II de 20%; (v) poder do teste estatístico de 80%; (vi) tamanho do efeito 50% (baseado nos valores de diferença alvéolo-arterial de oxigênio obtidos por Chang et al. (2015)). De acordo com os parâmetros supracitados, a amostra foi de 14 animais por grupo.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília, protocolo número 66701/2016.

3.2 MODELO ANIMAL E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 42 ratos da raça Wistar (± 300 g, 8-10 semanas), machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Católica de Brasília, Taquatinga - DF. Os ratos foram divididos, através de tabela de números aleatórios, em 3 grupos:

- Controle (SHAM): composto por 14 animais, submetidos a laparotomia e manipulação do ducto biliar comum, sem ligadura;
- Doente sem treinamento (SHP): composto por 14 animais, submetidos ao procedimento de ligadura do ducto biliar comum (LDBC);

- Doente submetido ao treinamento combinado (SHP+EXER): composto por 14 animais, submetidos a LDBC e ao protocolo de treinamento.

Para o procedimento cirúrgico, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (75 mg.Kg^{-1}) e cloridrato de xilazina (10 mg.Kg^{-1}) via intraperitoneal, pesados em balança digital (Filizola MF-6, São Paulo, SP) e posicionados em decúbito dorsal na mesa cirúrgica. Foi realizada assepsia da região abdominal seguida por uma incisão mediana no abdômen e localização do ducto biliar comum. Para os animais do grupo SHAM, o ducto biliar comum foi manipulado, sem ligadura. Para os animais dos grupos SHP e SHP+EXER, foi realizada a LDBC, de acordo com Fallon et al. (1997), utilizando fio de algodão 2.0. Em seguida, o abdômen foi suturado em camadas, primeiro a musculatura e depois a pele, com fio de náilon 3.0. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram alojados em caixas padrão, em ambiente controlado com ciclos de 12 horas claro e 12 horas escuro durante todo o período do estudo. Os animais tiveram acesso *ad libitum* à comida e água. Nas 72 horas que seguiram o procedimento cirúrgico, os animais receberam analgesia, por meio da administração de metadona ($0,4 \text{ mg.Kg}^{-1}$, via subcutânea) a cada 12 horas.

3.3 TESTES FÍSICOS

3.3.1 Teste máximo de corrida

O teste máximo de corrida (TMC) foi utilizado para avaliar a capacidade física dos animais e determinar a intensidade de treinamento aeróbico. O teste consistiu em colocar o animal para correr na esteira (EMG System do Brasil, São José dos Campos – SP, Brasil) até a exaustão, ou seja, até o momento no qual ele não foi capaz de continuar correndo mesmo após estímulo mecânico. O teste era iniciado com a

velocidade da esteira ajustada a 0,2 Km/h e, a cada dois minutos, a velocidade era incrementada em 0,3 km/h (CONTI et al., 2015; RODRIGUES et al., 2007; SANCHES et al., 2015). A velocidade máxima (Vel_{máx}) foi definida como o valor máximo que cada animal conseguiu alcançar. O teste foi realizado antes do início do protocolo de treinamento, após 17 dias e ao final do treinamento.

3.3.2 Teste de carga máxima

Para determinar a carga do treinamento resistido, uma escada adaptada para ratos foi confeccionada de acordo com o estudo de Sanches et al. (2014). A escada possui 1 metro de comprimento, 20 centímetros de largura, 50 degraus, com 2 centímetros de distância entre cada um e 80 graus de inclinação. No topo da escada havia uma caixa adaptada para permitir o repouso necessário do animal entre as repetições do exercício. O peso utilizado como carga foi produzido com pesos de alumínio utilizados para pesca e foi fixado na base da cauda do animal. O teste iniciou com carga de 75% do peso corporal que foi, progressivamente, aumentada em 15% do peso corporal na subida subsequente. No teste intermediário e final, este incremento foi de 25 e 40%, respectivamente. Este incremento foi repetido até o animal ser incapaz de subir a escada carregando a carga. Um intervalo de 2 minutos foi permitido entre cada repetição e no máximo 6 repetições foram executadas. O valor de 1 repetição máxima (1RM) foi definido como a última carga que o animal foi capaz de carregar (SANCHES et al., 2014). O teste foi realizado antes do início do protocolo de treinamento, após 17 dias e ao final do treinamento.

3.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO

O protocolo de treinamento teve início 15 dias após a LDBC. Os ratos realizaram o treinamento combinado, 5 vezes por semana, por 5 semanas, em dias alternados. A intensidade do treinamento foi moderada, de 40 a 60% da Velmáx ou 1RM.

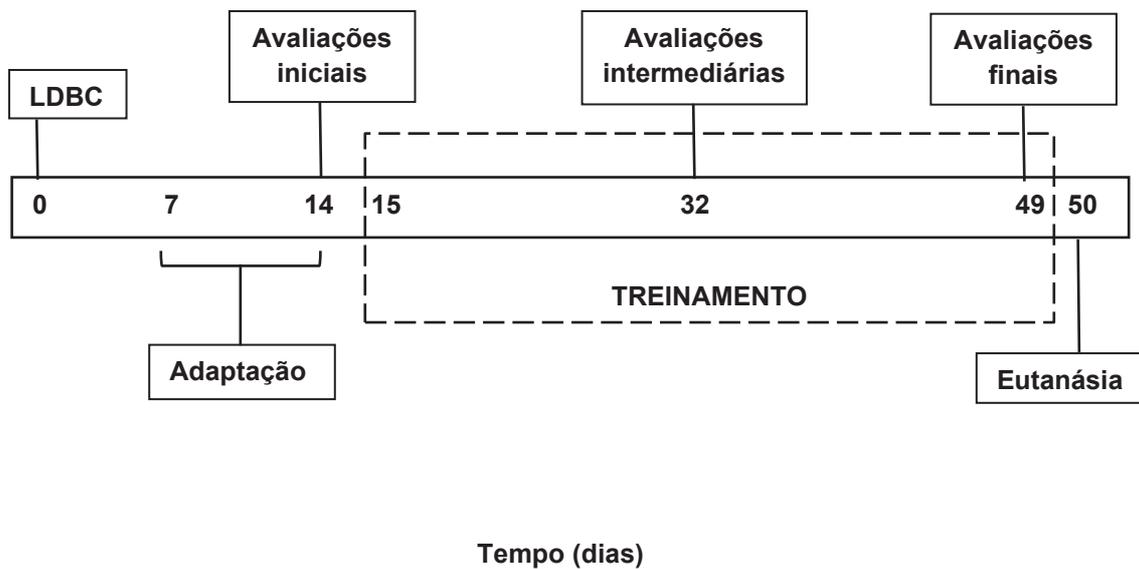


Figura 3.1 – Fluxograma do experimento.

3.4.1 Treinamento aeróbico

Os animais foram colocados na esteira (EMG System do Brasil, São José dos Campos – SP, Brasil) uma semana antes do início do protocolo (5 vezes por semana, 10 minutos/dia, 0,2 km/h) para adaptação e, no último dia, foi realizado o teste máximo de corrida (CONTI et al., 2015; SANCHES et al., 2015). O treinamento consistiu em 1 hora de exercício (10 minutos de aquecimento a 40% da Velmáx, 40 minutos a 60% Velmáx e 10 minutos de desaceleração a 40% Velmáx).

3.4.2 Treinamento resistido

Os animais foram adaptados a escada uma semana antes do início do protocolo e no último dia da fase de adaptação, foi realizado o teste de repetição máxima. Para adaptação, os animais foram colocados nos primeiros degraus da escada e incentivados a subir através de estímulos mecânicos leves até que conseguissem chegar ao topo da escada. Não houve estímulo elétrico e nem restrição de alimentos. Para o treinamento, cada animal realizou, por sessão, 15 subidas na escada com intervalo de 1 minuto entre cada repetição, com carga de intensidade moderada (40-60% de 1RM). A carga de treinamento foi prescrita de acordo com a carga máxima suportada por cada animal e ajustada semanalmente de acordo com o seu peso corporal. Após o teste intermediário (17 dias), a carga de treinamento foi ajustada de acordo com os novos valores obtidos no teste de 1 repetição máxima. A intensidade e o número de repetições para cada intensidade estão descritos na Tabela 3.1 com base no estudo de Sanches et al (2014).

Tabela 3.1 – Prescrição da carga do treinamento resistido

	Semana		
	1 ^a e 2 ^a	3 ^a e 4 ^a	5 ^a
	0 (1)	0 (2)	0 (1)
	30 (1)	40 (2)	40 (2)
% da intensidade	40 (2)	50 (3)	50 (4)
máxima (número	50 (3)	60 (3)	60 (4)
de subidas)	60 (2)	50 (3)	50 (2)
	50 (3)	40 (1)	40 (1)
	40 (1)	0 (1)	0 (1)
	30 (1)		
	0 (1)		

3.5 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS DO SISTEMA RESPIRATÓRIO

Após 7 semanas do procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados, como descrito previamente, pesados e traqueotomizados. Para este procedimento, foi realizada uma incisão cervical acima do esterno, divulsão da musculatura e isolamento da traqueia. Uma cânula metálica (6 cm de comprimento, 2 mm de diâmetro interno e 2,5 mm de diâmetro externo) foi inserida na traqueia e fixada com fio de seda 3.0. Os animais foram totalmente paralisados com Brometo de pancurônio ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) via intra-venosa e conectados a um ventilador mecânico específico para animais de pequeno porte (FlexiVent FX, Scireq, Montreal - Canadá). Os parâmetros ventilatórios utilizados, foram: ciclos respiratórios disparados, limitados e ciclados a tempo, com fração inspirada de oxigênio de 21%, frequência respiratória $90 \text{ ciclos.minuto}^{-1}$, volume corrente de 8 mL.Kg^{-1} e pressão ao final da expiração (PEEP) de $3 \text{ cmH}_2\text{O}$.

3.5.1 Avaliação da resistência e elastância do sistema respiratório

Para medida da resistência e elastância do sistema respiratório foi utilizado o modelo linear de compartimento único, que representa o sistema respiratório, de forma simples, como um tubo conectado em série a um balão (FIGURA 3.2 A). Para este modelo deve-se considerar como propriedades constitutivas dos seus componentes, as propriedades elásticas do balão e a resistência ao fluxo de ar imposta pelo tubo cilíndrico, supondo que estas propriedades são lineares, independentes do volume e do fluxo e que as forças inerciais são desprezíveis (BATES et al., 2011).

Considerando a linearidade deste modelo, a pressão de recolhimento elástico (P_{el}) do balão aumenta linearmente com o volume de gás dentro dele, enquanto, a diferença de pressão (ΔP) entre os extremos do tubo varia linearmente com o fluxo através deste (FIGURA 3.1 B).

A P_{el} é responsável pelo retorno do compartimento ao seu volume original quando a pressão de distensão cessa, da mesma forma que ocorre na expiração passiva quando os músculos inspiratórios relaxam. E a ΔP é necessária para movimentar o gás, de forma semelhante que ocorre o movimento do ar pelas vias aéreas. A pressão total através deste modelo, desde a entrada do tubo cilíndrico até a parte externa do balão, é a soma das pressões de recolhimento elástico e a diferença de pressão no tubo (BATES et al., 2011).

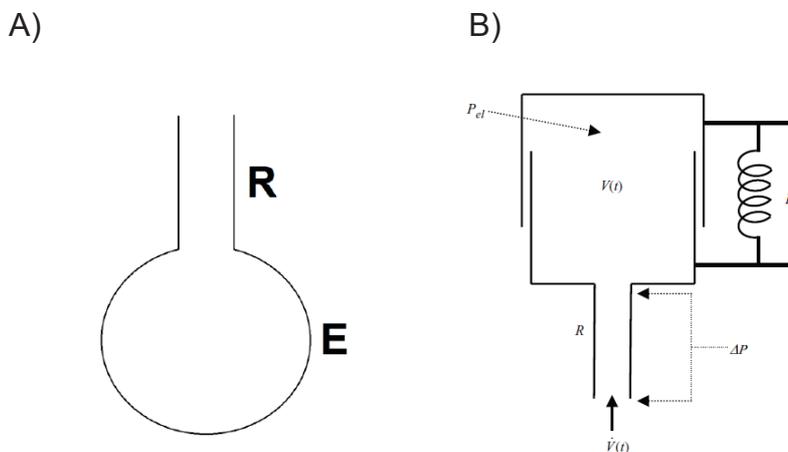


Figura 3.2 - A) Representação esquemática do sistema respiratório por meio de balão e tubo, onde R representa a resistência do tubo e E a elastância do balão. B) Representação mecânica do modelo linear unicompartimental, P_{el} : pressão de recolhimento elástico, $V(t)$: volume, E: elastância, R: resistência, ΔP : diferença de pressão, $\dot{V}(t)$ fluxo. Bates, 2009.

O modelo unicompartimental pode ser representado por uma equação diferencial de primeira ordem, a equação do movimento:

$$P(t) = E \cdot V(t) + R \cdot \dot{V}(t) + P_0 \quad (1)$$

onde $P(t)$ é a pressão na abertura da via aérea, $E.V(t)$ e $R.\dot{V}(t)$ simbolizam, respectivamente, os componentes elásticos e resistivos do sistema respiratório, também determinadas propriedades constitutivas, P_0 é uma estimativa de PEEP e t é o tempo.

Com a equação do modelo unicompartimental e os dados mensurados durante a ventilação mecânica (P , V e \dot{V}) os parâmetros E , R e P_0 (Peep total) podem ser calculados. O método matemático utilizado para solucionar a equação do movimento, para a grande quantidade de conjunto de dados, é o ajuste dos mínimos quadrados.

Este método de medir as propriedades mecânicas do sistema respiratório não requer padrão ventilatório especial nem manobras de oclusão, portanto, pode ser aplicado ciclo a ciclo, em qualquer modo ventilatório, com qualquer padrão de fluxo inspiratório.

3.5.2 Avaliação da impedância do sistema respiratório

Além de elastância e resistência do sistema respiratório, também foram avaliadas a impedância do sistema respiratório e as propriedades mecânicas do tecido pulmonar. Impedância é um termo usado para descrever um tipo especial de função de transferência (BATES, 2009) e no sistema respiratório tem origem, principalmente, nas forças resistivas, elásticas e inertivas que se opõem aos movimentos inspiratórios e expiratórios (CARVALHO; ZIN, 2011)

No campo da mecânica pulmonar a relação, no domínio da frequência, se expressa entre fluxo e pressão. Se um sinal de fluxo e/ou pressão for aplicado na abertura da via aérea e um sinal correspondente de pressão e/ou fluxo for mensurado no mesmo local, os dois sinais se relacionam através da equação:

$$P(f) = Z(f).\dot{V}(f) \quad (2)$$

onde $P(f)$ e $\dot{V}(f)$ são os resultados da transformada de Fourier de $P(t)$ e $\dot{V}(t)$, respectivamente, e $Z(f)$ é chamada impedância de entrada, porque está relacionada a duas medidas realizadas na entrada dos pulmões.

Esta equação sugere que a determinação da impedância deve ser realizada aplicando-se um sinal adequado de fluxo aos pulmões, medindo-se os sinais resultantes de pressão, e com a transformada rápida de Fourier de ambos os sinais, executa-se o cálculo:

$$Z(f) = \frac{P(f)}{\dot{V}(f)} \quad (3)$$

A técnica de oscilação forçada (TOF) é um método que aplica uma gama de sinais de fluxo nos pulmões com o objetivo de mensurar a impedância. Neste estudo, foi empregada a TOF com frequências na faixa de 0,25 a 19,625Hz. Um sinal contendo 19 ondas senoides, com duração de 8 segundos, foi aplicada na abertura das vias aéreas durante pausas na ventilação mecânica regular.

A impedância (Z) é uma função complexa da frequência e possui dois componentes independentes, uma parte real determinada resistência e uma parte imaginária determinada reatância (BATES et al., 2011). Para se obter os complexos valores da impedância do sistema respiratório o modelo de fase constante, descrito por Hantos et al. (1992) é empregado por meio da equação:

$$Z(f) = R_N + i\omega I + \frac{G-iH}{\omega^\alpha} \quad (4)$$

R_N é a resistência Newtoniana, I representa a inertância, G representa a energia dissipada dentro do tecido e H a energia armazenada nos tecidos. De acordo com a equação 4, os parâmetros R_N , I , G e H são linearmente relacionados com Z , conseqüentemente, seria fácil adaptar as medidas experimentais a este modelo utilizando regressão linear múltipla se não fosse pela presença do α no denominador

do último termo da equação, porém, uma forma interativa pode ser empregada, como sugere Bates (2009), começando por considerar $\alpha = 1$.

Com isso pode-se obter os valores de R_N , I , G e H usando regressão linear múltipla. O próximo passo é calcular o valor estimado de α usando os valores estimados de G e H pela equação:

$$\alpha = \frac{2}{\pi} \tan^{-1} \frac{H}{G} \quad (5)$$

Usando este novo valor de α na equação 4, obtém-se valores atualizados de R_N , I , G e H , por meio de regressão linear múltipla. Isso leva a valores atualizados de α e assim por diante. Estas etapas podem ser repetidas quantas vezes forem necessárias, porém, há uma convergência dos valores em quatro ou cinco iterações.

De acordo com este modelo, R_N representa a resistência da via aérea, I representa a inertância do gás nas vias aéreas centrais e juntos, R_N e I , estão relacionados com a impedância das vias aéreas. A impedância tecidual é, coletivamente, representa por G e H . G representa o componente dissipativo e está, portanto, relacionado a resistência tecidual. H representa a energia armazenada no tecido e está relacionado a elastância tecidual (BATES, 2009).

No entanto, G e H não são, exatamente, o mesmo que resistência e elastância porque não apresentam a mesma unidade de medida. As unidades de medida de G e H são determinadas por seus valores relativos. Na equação 4, quando Z é expresso em $\text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{s} \cdot \text{L}^{-1}$, G e H apresentam unidades de medida em $\text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{s}^{1-\alpha} \cdot \text{L}^{-1}$, sendo que estas unidades mudam de acordo com o valor de α , que é determinado pela equação 5 (BATES, 2009).

Um caminho para solucionar essa questão das unidades de medida é normalizar o termo da impedância tecidual da equação 4 pela frequência de referência ω_0 :

$$Z(f) = R_N + i(\omega)I + \frac{G-iH}{(\omega/\omega_0)^\alpha} \quad (6)$$

determinando $\omega_0 = 1$, os valores numéricos de G e H permanecem inalterados, ainda que, agora, eles tenham a mesma unidade de medida de Z (BATES, 2009).

3.6 AVALIAÇÃO INFLAMATÓRIA PULMONAR E SISTÊMICA

Após a avaliação das propriedades mecânicas do sistema respiratório, foi coletado sangue da artéria aorta abdominal (3 mL), para avaliação inflamatória sistêmica. O sangue foi armazenado em tubos específicos contendo anticoagulante (BD Vacutainer® contendo EDTA K2 7,2 mg), em seguida, foi centrifugado (Centrífuga NT 825, Novatecnica) a 3500 rpm por 10 minutos, o plasma foi separado, transferido para um eppendorf e armazenado a -80°C . Após a coleta de sangue, os animais sofreram eutanásia por exsanguinação.

O lavado broncoalveolar (LBA) foi coletado do pulmão direito, através da instilação de 5 mL de soro fisiológico estéril (0,9% de NaCl) pela cânula traqueal que, em seguida, foi aspirado e transferido para um tubo do tipo Falcon. A amostra foi centrifugada a 1500 rpm a 4°C por 10 minutos (Centrífuga NT 825, Novatecnica) para separar o sobrenadante do botão celular. O sobrenadante foi armazenado a -80°C para análise das citocinas.

Para contagem diferencial das células, o botão celular foi ressuspendido em 1 mL de soro fisiológico estéril e uma alíquota de 50 microlitros (μL) foi utilizada para confeccionar uma lâmina em centrífuga específica para esta finalidade (Centrífuga Cellspin I, Tharmac). Após secagem, as lâminas foram coradas com Diff Quick® (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) para diferenciação celular. Para contagem foi utilizado o microscópio biológico binocular (EK 2000, Eikonai, Brasil) e foram contadas 100 células por lâmina.

A concentração das citocinas no plasma e no LBA foi determinada pelo método de citometria de fluxo utilizando-se o conjunto de imunoenaios da BD Biosciences® (CBA, San Diego, CA, USA), específico para avaliar os seguintes mediadores: interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interferon- γ (INF- γ) e fator de necrose tumoral (TNF). As avaliações foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante. Os padrões de citocinas reconstituídas e as amostras foram processadas utilizando o citômetro BD FACS Verse®. Duzentos eventos ou mais foram adquiridos para cada citocina. Os dados foram analisados utilizando-se o software FCAP, versão 3.0 (BD Biosciences®, San Diego, CA, USA). As curvas padrão para cada citocina foram geradas utilizando-se diluições seriadas dos mediadores fornecidos, com concentração em cada soro determinada por interpolação da curva padrão correspondente.

3.7 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DO TECIDO PULMONAR

Coração e pulmão esquerdo foram excisados em bloco. O brônquio fonte esquerdo foi clampeado e solução de formalina a 10% foi infundida na tranqueia a uma pressão transpulmonar de 20cm/H₂O por 24 horas e armazenado na mesma solução de preservação (BRABER et al., 2010). Após fixação, o tecido pulmonar foi embebido em parafina e processado para cortes histológicos. Em seguida, fatias com 3 micrômetros de espessura foram obtidas e coradas com picrossírius para análise de fibras colágenas.

A análise morfométrica do tecido pulmonar foi realizada como descrito por Gundersen et al. (1988) com a utilização de um sistema teste coerente e de referência

(FIGURA 3.3) composto por 100 pontos e 50 linhas acoplado à uma das oculares do microscópio óptico (EK 2000, Eikonol, SP, Brasil).

No parênquima pulmonar, o volume percentual de fibras colágenas foi mensurado dividindo o número de pontos que incidem essas fibras pelo número total de pontos no septo alveolar, com aumento de 1000x, em 20 campos aleatórios por animal. O volume de fibras colágenas na via aérea também foi quantificado, com aumento de 1000x, em 5 vias aéreas médio/grande (via aérea com perímetro de membrana basal acima de 1mm) por animal, aleatoriamente selecionadas (RAMO-BARBÓN et al., 2005). O volume percentual de fibras colágenas foi mensurado dividindo o número de pontos que incidem essas fibras pelo número de pontos que incidem na via aérea. O perímetro de membrana basal foi calculado utilizando o software ImageJ (Research Services BRanch, National Institute of Mental Health, Bethesda, USA).

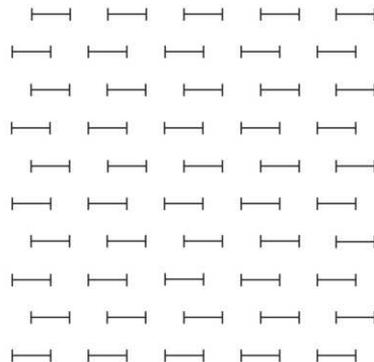


Figura 3.3 - Sistema teste coerente e de referência.

3.8 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DO FÍGADO

Para avaliação morfológica do fígado, uma porção do tecido hepático foi coletada, armazenada em formalina, fixada, embebido em parafina e lâminas com 3

micrômetro de espessura foram obtidas e corados com picrossírius para identificar fibras colágenas. Vinte campos aleatórios e não coincidentes por animal foram analisados, com aumento de 1000x, para quantificar o volume percentual de fibras colágenas, como descrito anteriormente.

3.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada em fatias de 4 micrometros de espessura do tecido previamente preparado em lâminas silanizadas. As fatias foram incubadas com anticorpo primário anti-P2X7 (sc-15200; diluição 1:150), anti-TFPI (sc-18712; diluição 1:200) e anti-IL-10 (sc-1873; diluição 1:200) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), e com anticorpos secundários apropriados conjugados com biotina-estreptavidina-peroxidase. Como controle das reações imuno-histoquímicas, fatias foram coradas somente com anticorpo primário (sem anticorpo secundário) e secundário (sem anticorpo primário). Nos pulmões, a expressão do receptor de P2X7, IL-10 e inibidor da via do fator tecidual (TFPI) foi quantificada no epitélio (correspondendo a porcentagem de epitélio que expressa cada uma dessas proteínas e a densidade de leucócitos positivos para cada uma das proteínas). A área do epitélio foi mensurada e a área positiva para cada anticorpo foi determinada utilizando um programa para análise de imagens (Image-Pro Plus; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Os resultados são expressos como a porcentagem de área positiva imunocorada em relação ao total da área de epitélio (VIEIRA et al., 2011; VIEIRA et al., 2008). A densidade de leucócitos positivos para cada anticorpo foi determinada por um investigador cego que contou 15 fatias de parênquima alveolar (área do septo alveolar, excluindo a área dos capilares

pulmonares) para cada animal com aumento de 1000x. A expressão de cada proteína também foi mensurada no fígado. Em síntese, a área do parênquima hepático e a área imunocorada para cada proteína foi mensurada e, a área imunocorada é apresentada como a porcentagem de parênquima hepático positivo (AYATA et al., 2012).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade da distribuição dos dados foi examinada com a utilização do teste de Shapiro-Wilk. A hipótese nula de que não havia diferença entre os grupos após o treinamento ou após o período estudado foi testada com a utilização da análise de variância de um fator (ANOVA *one-way*) ou teste de Kruskal-Wallis. No caso de rejeição da hipótese nula, o pós-teste de *Tukey* e Mann-Whitney foi empregado para comparação emparelhada dos grupos, para dados paramétrico e não paramétricos, respectivamente.

O teste *T Student* foi utilizado para comprar o tempo máximo de corrida inicial e final intragrupo e o teste de Mann-Whitney para comparar a força máxima inicial e final intragrupo. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa *Statistical Package for Social Science* (IBM SPSS *Statistics*, Versão 20.0, Armonk, NY, IBM Corp.). Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão quando paramétricos ou mediana [intervalo interquartilico] quando não paramétricos e o nível de significância adotado foi 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 PESO DOS ANIMAIS

No início do protocolo experimental, o peso dos animais não diferiu entre os grupos, no entanto, no final do período de estudo, os animais dos grupos SHP e SHP+EXER pesaram menos quando comparados aos animais do grupo SHAM (FIGURA 4.1).

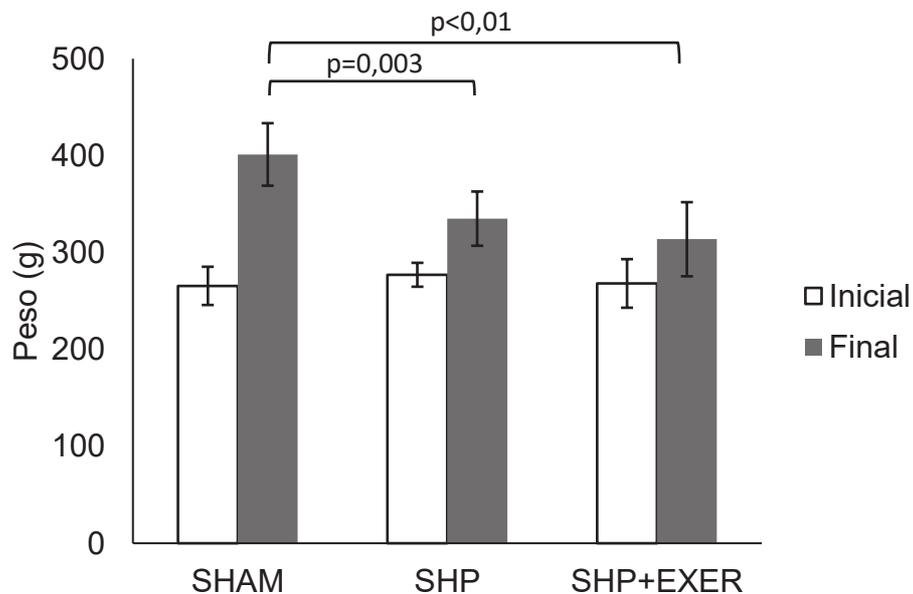


Figura 4.1 - Peso inicial e final dos animais. As colunas representam a média e as barras sobrepostas as colunas representam o desvio-padrão.

4.2 CAPACIDADE MÁXIMA DE EXERCÍCIO

A capacidade máxima de exercício dos animais do grupo treinado aumentou 38% (342,3 segundos) após o protocolo de treinamento combinado, enquanto a

capacidade máxima de exercício dos animais do grupo SHAM não alterou no período de estudo e os animais do grupo SHP diminuíram em 22,3% (176 segundos) sua capacidade máxima de exercício. Na comparação intergrupo, avaliada pela diferença no tempo final menos inicial, os animais do grupo SHP+EXER aumentaram o tempo no TMC comparado aos grupos SHAM e SHP, como descrito na figura 4.2.

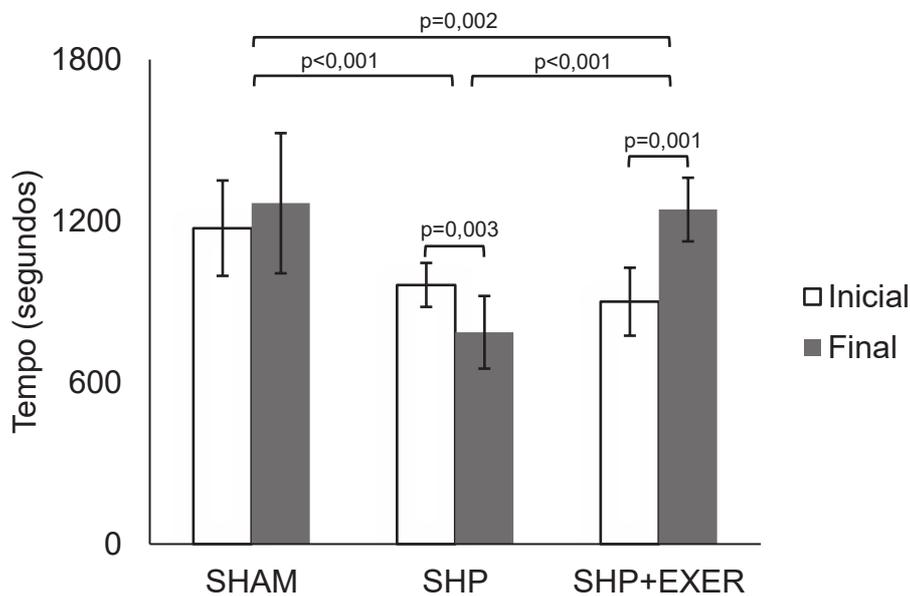


Figura 4.2 - Teste máximo de corrida em tempo (segundos). As colunas representam a média e as barras sobrepostas as colunas representam o desvio-padrão.

4.3 TESTE DE FORÇA MÁXIMA

Após 5 semanas de treinamento combinado, a força máxima dos animais, avaliada pelo teste de força máxima, permaneceu inalterada no grupo SHAM. Em contraste, nos animais do grupo SHP diminuiu em 20,1% e aumentou significativamente nos animais treinados em 42,5% (TABELA 4.1). Na análise de

variância, a força máxima do grupo treinado foi maior quando comparada ao grupo SHP, porém, não diferiu do grupo SHAM (FIGURA 4.3).

Tabela 4.1 – Teste de carga máxima (% peso corporal)

Grupo	Inicial	Final	p-valor
SHAM	105 [105 – 116,2]	108 [108 – 117,1]	p = 0,64
SHP	105 [105 – 105]	84,1 [78,3 – 101]	p < 0,001
SHP+EXER	105 [105 – 120]	155 [155 – 155]	p < 0,001

Valores expresso em mediana [intervalo interquartilico]. SHAM: grupo SHAM; SHP: grupo SHP; SHP+EXER: grupo SHP+EXER

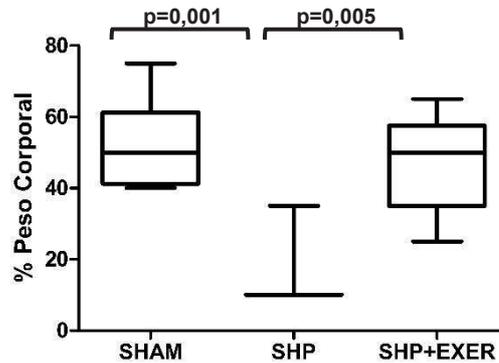


Figura 4.3 - Representação gráfica da diferença de força máxima final e inicial, em porcentagem de peso corporal.

4.4 PROPRIEDADES MECÂNICAS DO SISTEMA RESPIRATÓRIO

A SHP não modificou as propriedades resistivas do sistema respiratório nem das vias aéreas. No entanto, houve elevação da elastância do sistema respiratório e da conservação de energia em tecidos que não foram modificadas pelo protocolo de exercício combinado. Todos os valores das variáveis mecânicas estudadas estão descritos na tabela 4.2.

Tabela 4.2– Propriedades mecânicas do sistema respiratório

	SHAM	SHP	SHP+EXER	p-valor
Rrs (cmH₂O.s.mL⁻¹)	0,10 ± 0,06	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,05	0,147
Ers (cmH₂O.mL⁻¹)	1,38 ± 0,08	1,98 ± 0,19	2,02 ± 0,37	0,001 ^{a-b}
R_N (cmH₂O.s.mL⁻¹)	0,07 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,04	0,198
G (cmH₂O.mL⁻¹)	0,24 ± 0,01	0,29 ± 0,06	0,36 ± 0,17	0,220
H (cmH₂O.mL⁻¹)	1,14 ± 0,20	1,89 ± 0,16	1,93 ± 0,33	0,0001 ^{a-b}

Valores expressos em média ± desvio-padrão. Rrs: resistência do sistema respiratório; Ers: elastância do sistema respiratório; R_N: resistência newtoniana; G: energia dissipada no tecido pulmonar; H: energia armazenada no tecido pulmonar. a: SHAM x SHP; b: SHAM x SHP+EXER.

4.5 INFLAMAÇÃO PULMONAR

A análise do LBA mostrou significativo aumento na concentração de IL-6 nos grupos SHP e SHP+EXER, comparado ao grupo SHAM. No entanto, não houve diferença na concentração das demais citocinas analisadas entre os grupos (IFN- γ , TNF, IL-10, IL-4 e IL-2) (FIGURA 4.4).

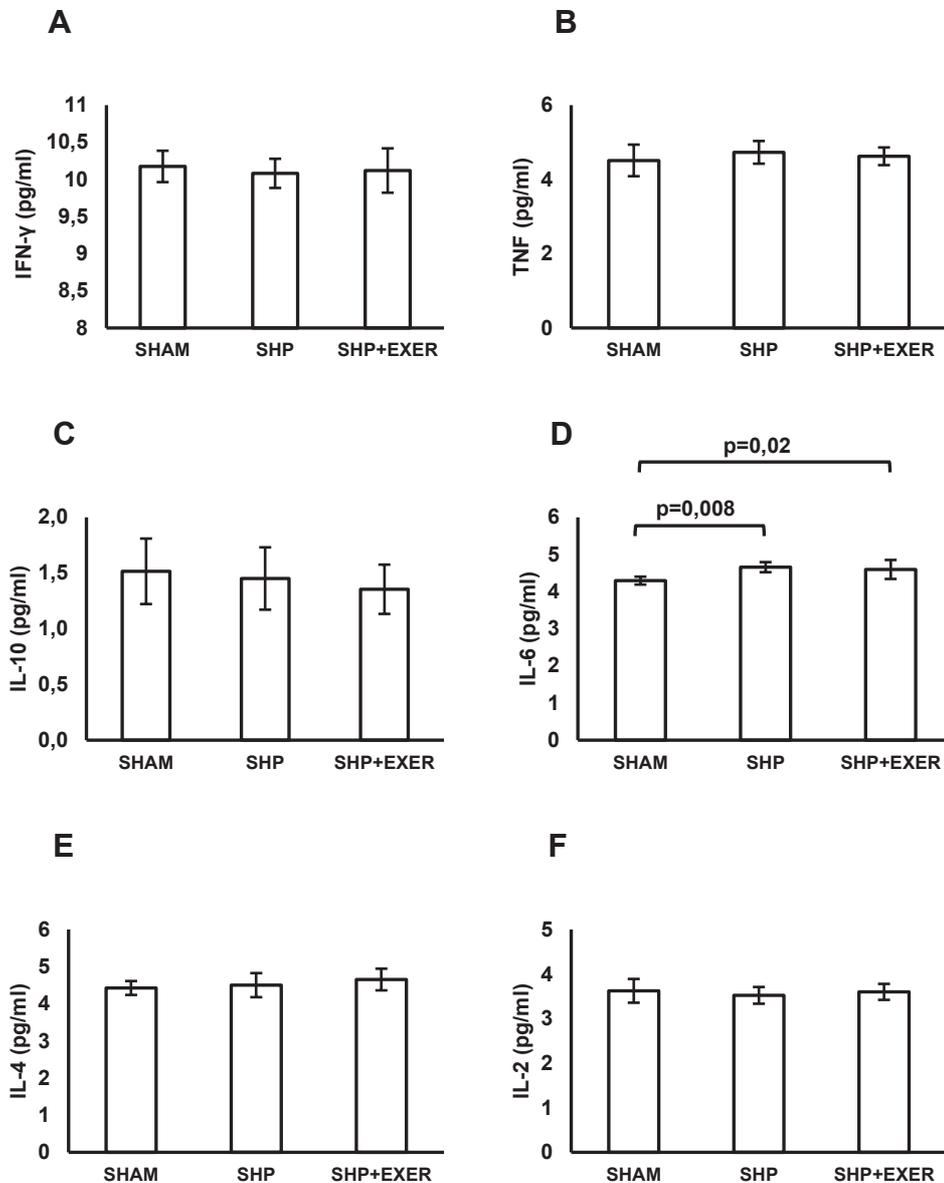


Figura 4.4 – Representação gráfica das citocinas no lavado broncoalveolar. A) interferon- γ (INF- γ); B) fator de necrose tumoral (TNF); C) interleucina 10 (IL-10); D) interleucina 6 (IL-6); E) interleucina 4 (IL-4) e F) interleucina 2 (IL-2). As colunas representam a média e as barras sobrepostas as colunas representam o desvio-padrão.

Analisando a inflamação pulmonar por meio da contagem diferencial de células, a quantidade de macrófagos, linfócitos e neutrófilos no grupo treinado não diferiu do grupo SHAM, no entanto, houve diferença entre os grupos SHAM e SHP (FIGURA 4.5).

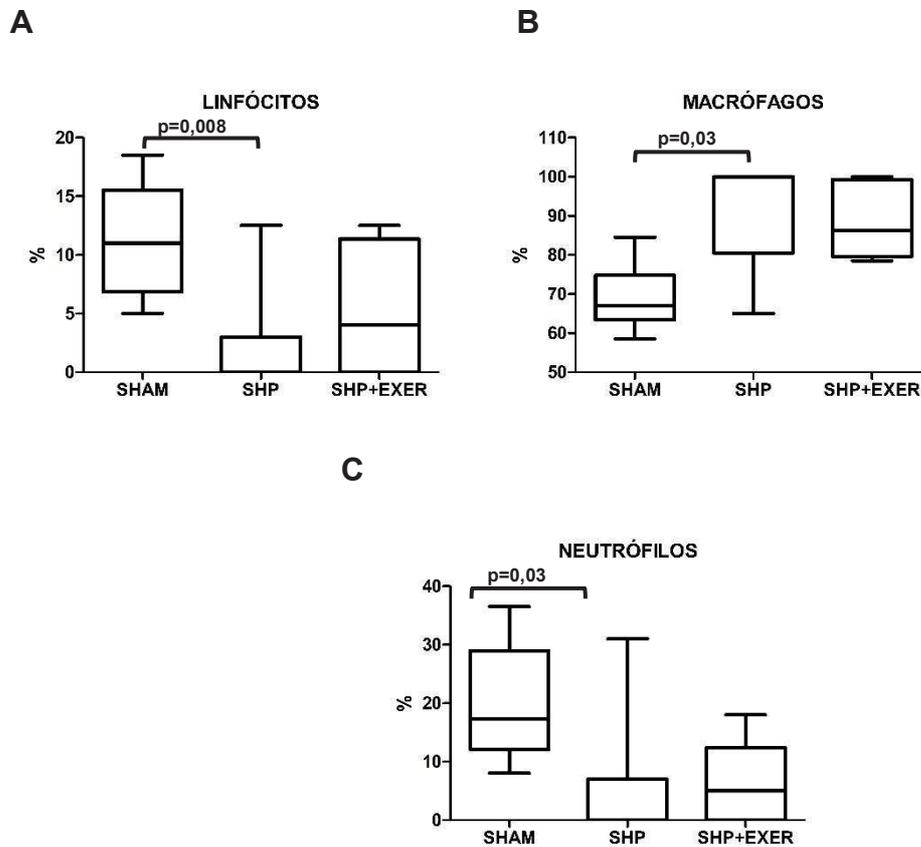


Figura 4.5 – Representação gráfica da contagem diferencial de células. A) Número de linfócitos; B) Número de macrófagos; C) Número de neutrófilos.

4.6 INFLAMAÇÃO SISTÊMICA

A análise do plasma mostrou significativo aumento na concentração das citocinas INF- γ , TNF, IL-6, IL-4 e IL-2 no grupo SHP, que não foi revertida pelo treinamento combinado, no entanto, a concentração de IL-10 permaneceu inalterada (FIGURA 4.6).

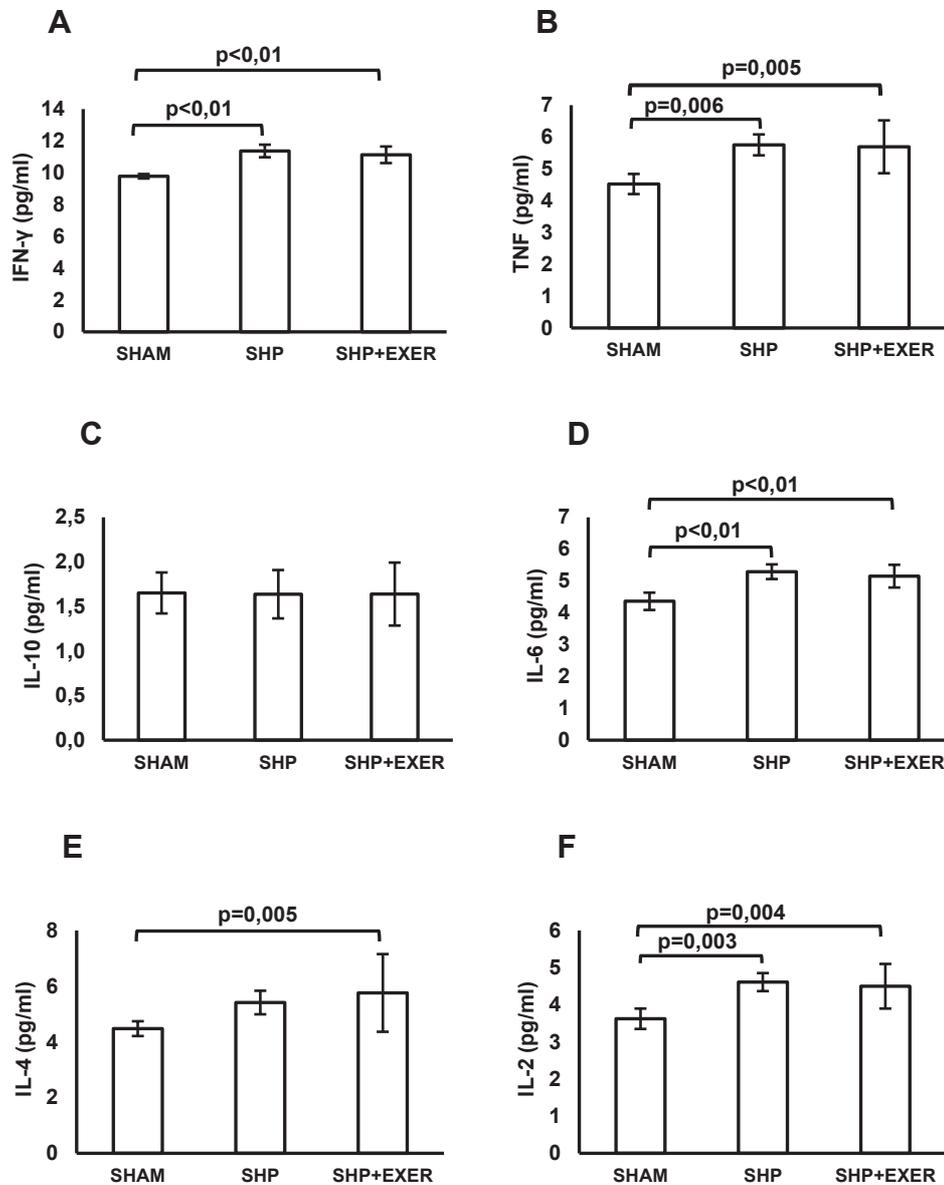


Figura 4.6 – Representação gráfica das citocinas no plasma. A) interferon- γ (INF- γ); B) fator de necrose tumoral (TNF); C) interleucina 10 (IL-10); D) interleucina 6 (IL-6); E) interleucina 4 (IL-4) e F) interleucina 2 (IL-2).

4.7 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO TECIDO PULMONAR E HEPÁTICO

O volume percentual de fibras colágenas no parênquima pulmonar foi similar entre todos os grupos estudados. No entanto, no grupo SHP houve aumento significativo do volume percentual de fibras colágenas nas vias aéreas intra-pulmonar e no fígado, que não foi atenuado pelo protocolo de treinamento combinado (TABELA 4.3 e FIGURA 4.7).

Tabela 4.3 - Volume percentual de fibras colágenas (%)

Volume percentual de fibras colágenas (%)	SHAM	SHP	SHP + EXER	p-value
Parênquima pulmonar	38,23 ± 2,63	36,88 ± 3,87	38,89 ± 3,73	0,78
Vias aéreas intra-pulmonar	39,49 ± 4,59	44,81 ± 3,29	45,01 ± 4,78	0,01 ^{a-b}
Fígado	16,22 ± 2,26	62,31 ± 9,26	59,92 ± 8,83	<0,001 ^{a-b}

Valores expressos em média ± desvio-padrão. SHAM: grupo SHAM; SHP: grupo SHP; SHP+EXER: grupo SHP+EXER; a: SHAM x SHP; b: SHAM x SHP+EXER.

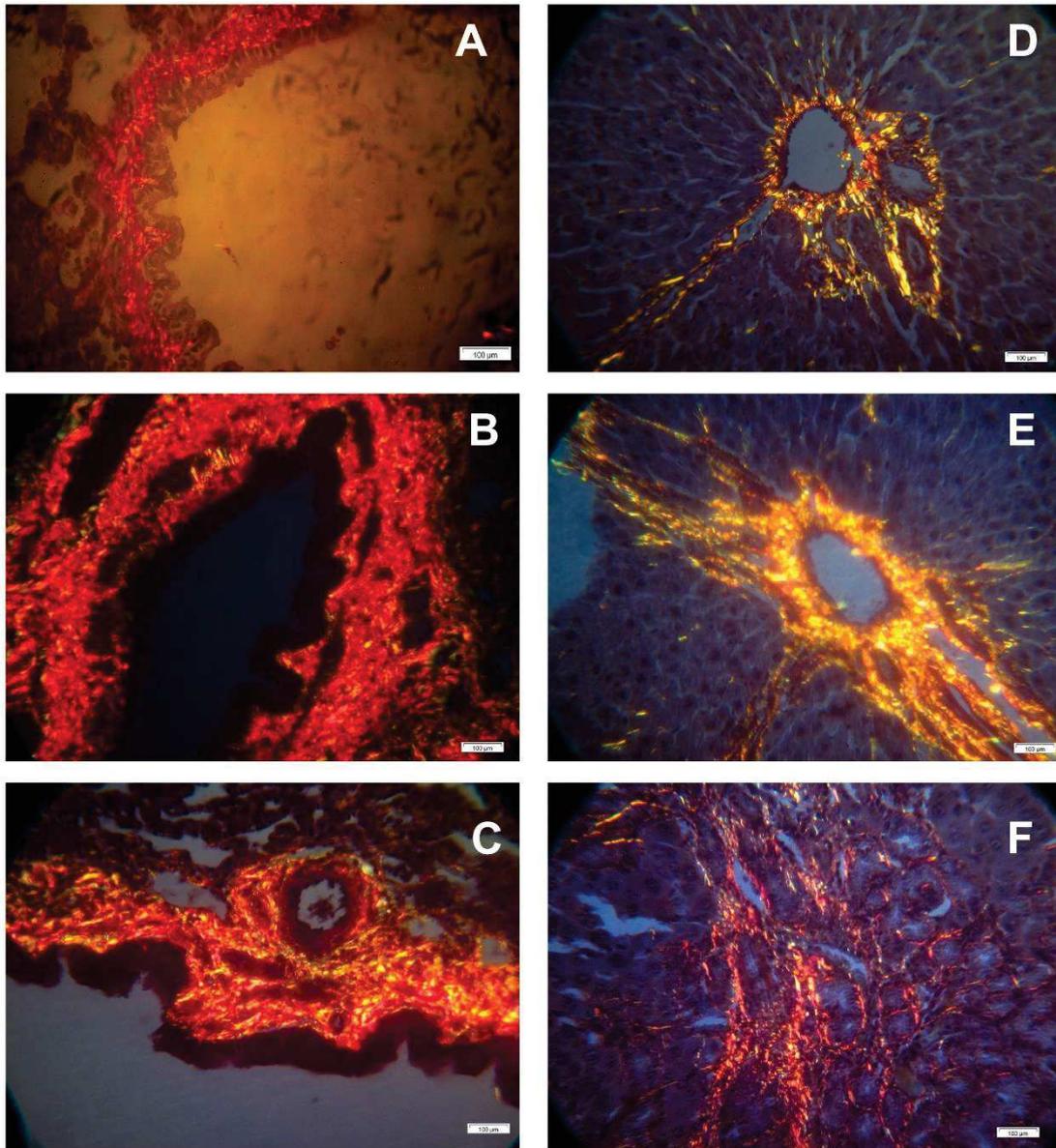


Figura 4.7 – Fotomicrografia da via aérea do grupo SHAM (A), grupo SHP (B) e grupo SHP+EXER (C). As figuras D, E e F são fotomicrografias referentes ao parênquima hepático dos grupos SHAM, SHP e SHP+EXER, respectivamente. Todos os tecido foram corados com picrosírius para identificação e quantificação das fibras colágenas utilizando luz polarizada.

4.8 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A tabela 4.4 apresenta a expressão de IL-10 no epitélio das vias aéreas, nos leucócitos do parênquima e no parênquima hepático. A expressão da IL-10 no epitélio

das vias aéreas foi significativamente reduzida no grupo SHP ($p < 0,01$) e parcialmente restabelecida pelo exercício, como observado no grupo SHP+EXER ($p < 0,01$). A expressão de IL-10 nos leucócitos do parênquima e no fígado não apresentaram diferença estatística entre os grupos.

Tabela 4.4 - Expressão da IL-10 no epitélio das vias aéreas, parênquima pulmonar e fígado.

	SHAM	SHP	SHP + EXER	P-value
Epitélio das vias aéreas				
IL-10	7,52 ± 5,83	1,45 ± 1,30	2,85 ± 3,57	<0,01 ^{a-b}
Parênquima pulmonar				
IL-10	0,26 ± 0,08	0,26 ± 0,06	0,20 ± 0,09	0,64
Fígado				
IL-10	5,09 ± 4,82	5,99 ± 7,47	3,58 ± 1,99	0,71

Valores expressos em média ± desvio-padrão. SHAM: grupo SHAM; SHP: grupo SHP; SHP+EXER: grupo SHP+EXER; IL-10: interleucina 10; a: SHAM x SHP; b: SHAM x SHP+EXER.

A expressão de P2X7 no epitélio das vias aéreas não diferiu entre os grupos. No entanto, a expressão de P2X7 nos leucócitos do parênquima aumentou no grupo SHP ($p < 0,01$) e diminuiu significativamente no grupo SHP+EXER ($p < 0,01$), como observado na figura 4.8 e 4.9. Em relação a expressão de P2X7 no fígado, não foi observado diferença entre os grupos.

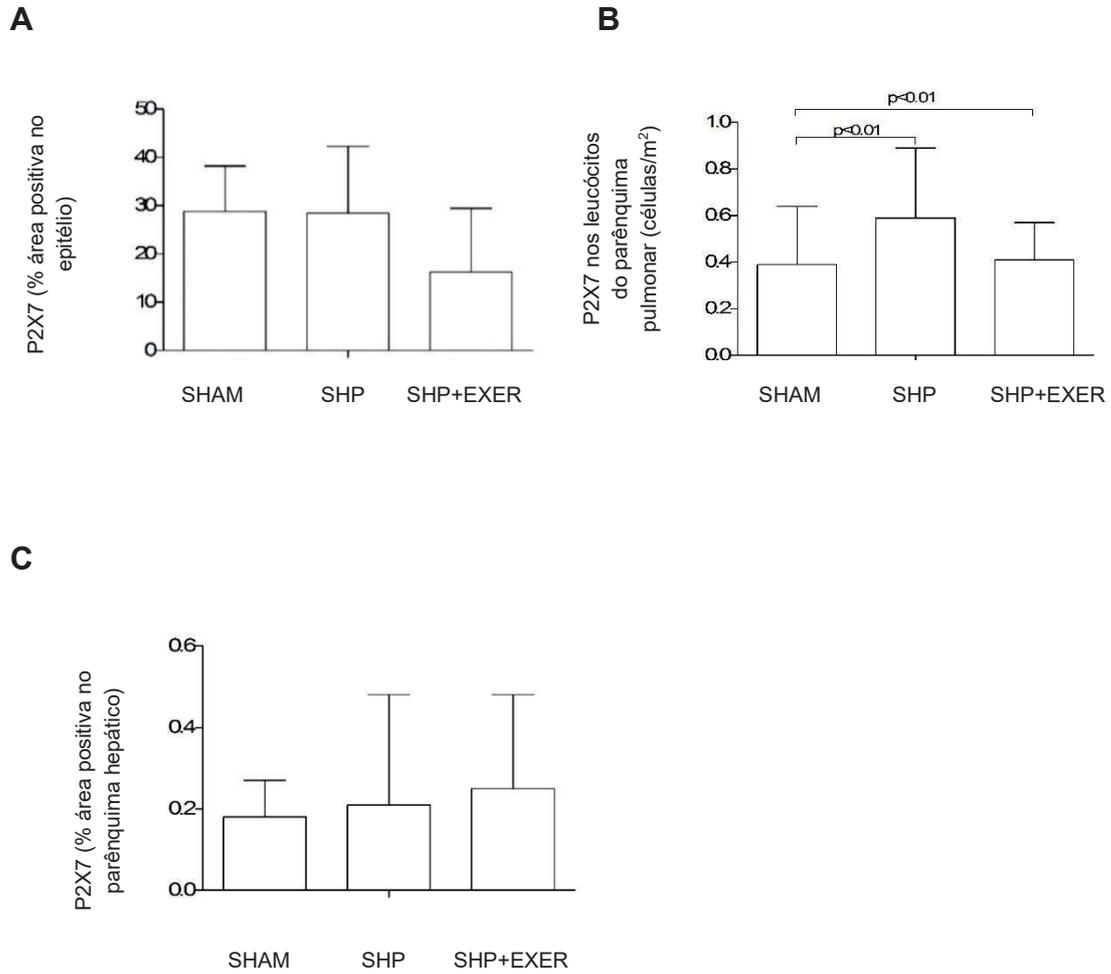


Figura 4.8 – Representação gráfica da expressão do P2X7 no epitélio da via aérea (A), nos leucócitos do parênquima pulmonar (B) e no parênquima hepático (C).

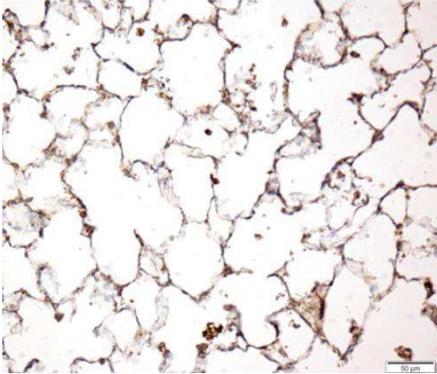
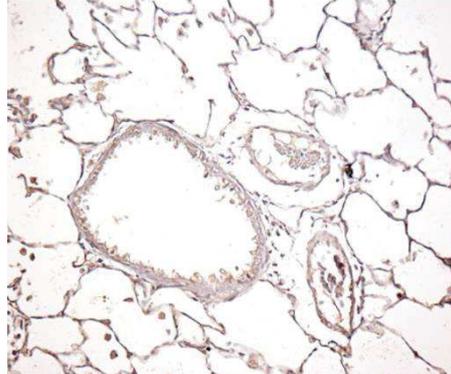
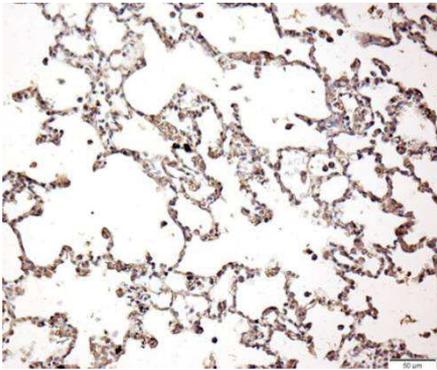
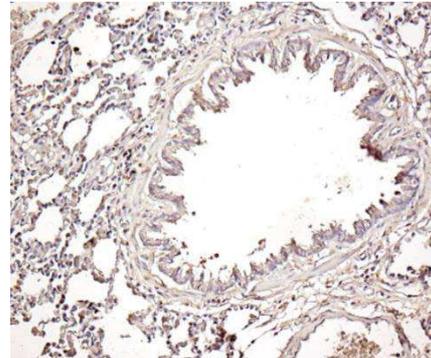
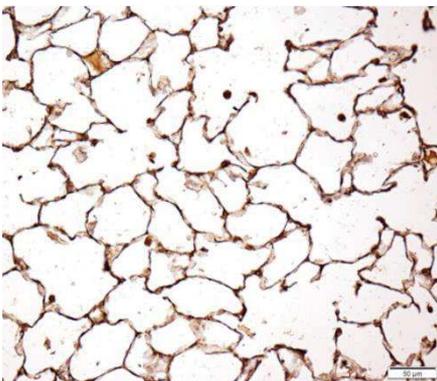
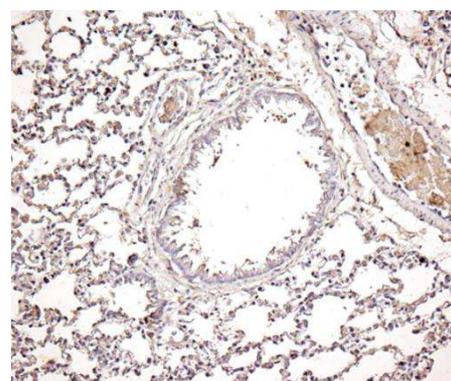
A1**B1****A2****B2****A3****B3**

Figura 4.9 – Fotomicrografia da expressão de P2X7 no leucócitos do parênquima pulmonar (A) e no epitélio das vias aéreas (B); A1 e B1 representam o grupo SHAM; A2 e B2 representam o grupo SHP; A3 e B3 representam o grupo SHP+EXER. As imagens estão aumentadas em 400x.

A expressão de TFPI no epitélio das vias aéreas foi maior no grupo SHP+EXER comparado ao grupo SHAM ($p<0,001$) e SHP ($p<0,001$). A expressão de TFPI nos leucócitos do parênquima aumentou no grupo SHP ($p<0,001$) comparado ao grupo SHAM e diminuiu após o treinamento, como observado no grupo SHP+EXER ($p<0,001$) (FIGURAS 4.10 e 4.11). Não houve diferença na expressão de TFPI no fígado entre os grupos.

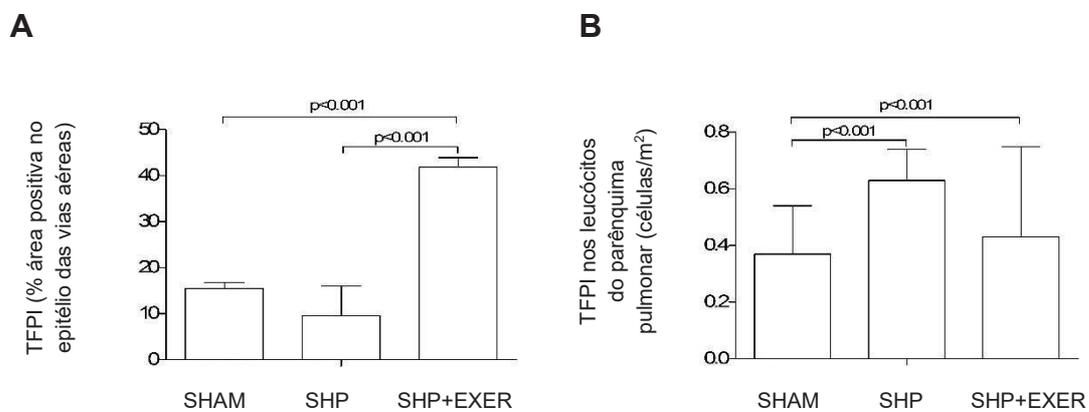


Figura 4.10 – Representação gráfica da expressão do TFPI no epitélio da via aérea (A) e nos leucócitos do parênquima pulmonar (B).

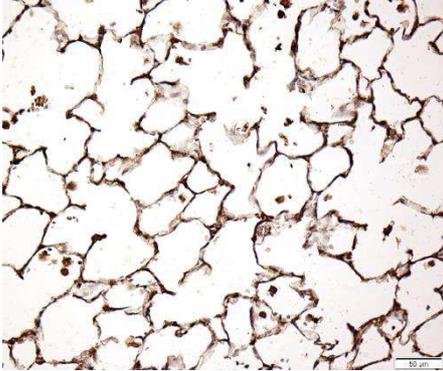
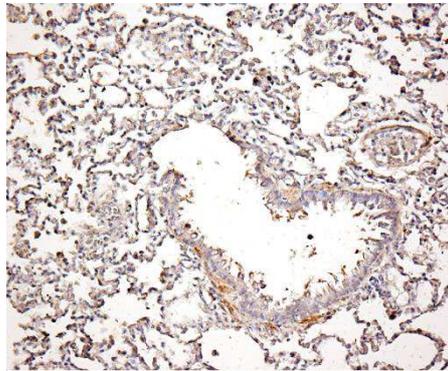
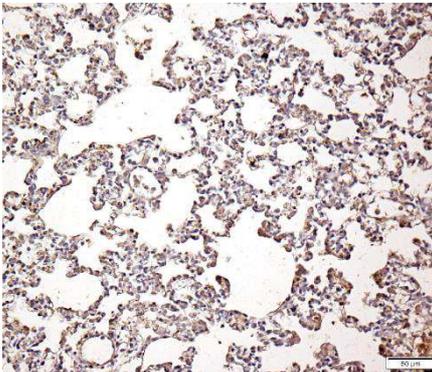
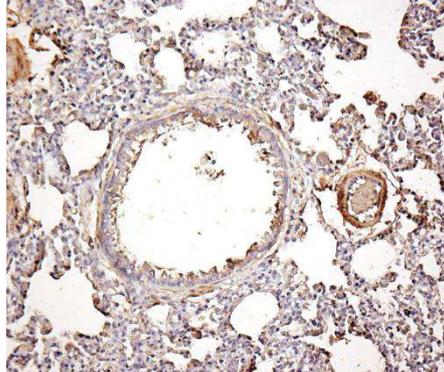
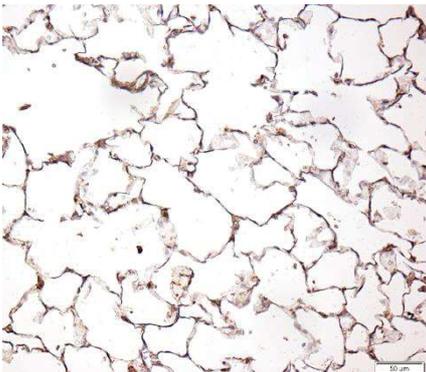
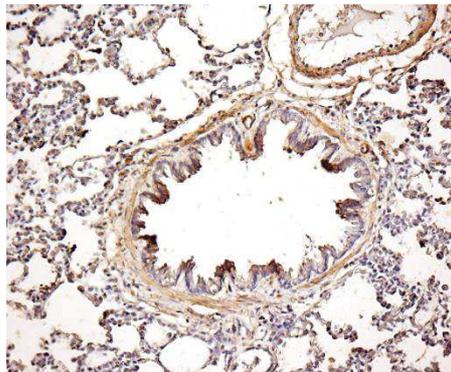
A1**B1****A2****B2****A3****B3**

Figura 4.11 – Fotomicrografia da expressão de TFPI no leucócitos do parênquima pulmonar (A) e no epitélio das vias aéreas (B); A1 e B1 representam o grupo SHAM; A2 e B2 representam o grupo SHP; A3 e B3 representam o grupo SHP+EXER. As imagens estão aumentadas em 400x.

5.DISSCUSSÃO

O presente trabalho avaliou os efeitos do exercício combinado de moderada intensidade no sistema respiratório, na morfologia dos tecidos pulmonar, muscular e hepático e no perfil inflamatório pulmonar e sistêmico em ratos com SHP. Para isto, os animais foram submetidos ao protocolo de treinamento combinado (aeróbico e resistido) por 5 semanas, 5 vezes por semana.

Os principais resultados deste estudo são: i) os animais que realizaram o protocolo de treinamento aumentaram a capacidade máxima de exercício quando comparado aos animais controle e doente sedentário; ii) a força máxima dos animais treinados foi maior quando comparada aos animais doentes e sedentários e semelhante ao controle; iii) a SHP não modificou as propriedades resistivas do sistema respiratório nem das vias aéreas; iv) houve elevação da elastância do sistema respiratório e da energia armazenada em tecidos nos animais com SHP que não foram modificadas pelo protocolo de treinamento; v) a SHP aumentou a concentração de IL-6 no lavado broncoalveolar, porém não houve alteração com o exercício; vi) a concentração plasmática das citocinas INF- γ , TNF, IL-6, IL-4 e IL-2 foi maior nos animais doentes quando comparado ao controle, porém, não alterou com o exercício.

Em estudo prévio realizado pelo grupo foi observado o aumento da diferença alvéolo-arterial de oxigênio (controle saudável: $5,1 \pm 0,47$ mmHg; animais com SHP: $15,5 \pm 0,76$ mmHg; $p < 0,0001$) utilizando o mesmo modelo animal de SHP empregado no presente estudo (MELO-SILVA et al; 2011). Além disso, observamos os sinais clínicos de doença hepática, como aumento do tamanho ducto biliar, icterícia e ascite nos animais submetidos a ligadura do ducto biliar. Ademais, as alterações nas propriedades mecânicas do sistema respiratório encontradas em nossas

investigações prévias (MELO-SILVA et al; 2011; GAIO et al., 2013) corroboram com o que encontramos no presente estudo, como discutido a seguir. Sendo assim, mesmo não avaliando os níveis arteriais de oxigênio, estabelecemos com sucesso o modelo de SHP.

Muito embora não tenhamos observado alteração nos danos mecânicos e no perfil inflamatório causados pela SHP após o protocolo de treinamento, os animais doentes e treinados foram capazes de aumentar sua capacidade de exercício e força muscular em decorrência do protocolo de treinamento. Considerando que para se alcançar melhora na capacidade de exercício, espera-se que alguma modificação ocorra nos sistemas cardiovascular, respiratório ou muscular, os nossos resultados não demonstraram melhorias no sistema respiratório após o período de treinamento e o sistema cardiovascular não foi objeto de estudo deste trabalho. Portanto, a melhora encontrada na capacidade de exercício e na força muscular, possivelmente, advém de modificações proporcionadas pelo treinamento físico ao sistema muscular, que permitiu aos animais melhores condições para aumentar o tempo no teste máximo de corrida e a força muscular avaliada pelo teste de 1RM.

As modificações das propriedades mecânicas do sistema respiratório encontradas neste estudo estão de acordo com as descritas por Melo-Silva et al. (2011). Estes desarranjos decorrem de fatores mecânicos relacionados ao abdômen, tais como a presença de ascite, o aumento do tamanho do ducto biliar comum, e ao tecido pulmonar, tal como remodelamento das vias aéreas e da circulação pulmonar, hiperfluxo sanguíneo pulmonar e alterações no surfactante pulmonar (YANG et al., 2014).

A alteração no surfactante pulmonar descrita em animais com SHP (YANG et al., 2014), somada ao aumento do fluxo sanguíneo pulmonar, principal característica da

SHP, ao aumento na proporção de fibras colágenas e elásticas e fatores mecânicos relacionados ao abdômen (MELO-SILVA et al., 2011) explicaria o aumento na elastância do SR e do tecido pulmonar observada em nossos resultados. O exercício aeróbico, além de minimizar os danos às propriedades mecânicas do sistema respiratório comumente encontrados em doenças respiratórias crônicas, como asma (SILVA et al., 2010), também apresenta efeito protetor quando realizado antes do início dos danos pulmonares, como na indução de pneumonia por *Pseudomonas* (OLIVO et al., 2014) e, também, na indução de lesão pulmonar aguda (REIS GONÇALVES et al., 2012), diminuindo a elastância e resistência do SR e do tecido pulmonar.

O aumento na concentração de NO, um agente vasodilatador, descrito como um dos principais agentes que levam às alterações vasculares encontradas na SHP, também pode ocasionar broncodilatação, e, conseqüentemente, diminuição da resistência das vias aéreas, sendo que, um efeito benéfico do exercício físico seria diminuir a produção de NO (VIEIRA et al., 2012). No presente trabalho, é possível observar que o grupo SHP (doente e sedentário), apresentou valores de resistência do SR e das vias aéreas menores que o grupo SHAM (saudável), compatíveis com uma possível dilatação brônquica. No entanto, no grupo SHP+EXER, esses valores se aproximaram dos valores observados no grupo SHAM, possivelmente, porque o exercício pode ter diminuído a produção e liberação de NO. Contudo, na análise estatística não foi detectada diferença significativa entre os grupos.

No contexto do exercício físico, há um crescente número de trabalhos que avaliam o efeito modulador e preventivo do exercício em doenças respiratórias crônicas, como asma (SILVA et al., 2010), DPOC (TOLEDO-ARRUDA et al., 2017), e

também em doenças agudas como síndrome do desconforto respiratório agudo (RIGONATO-OLIVEIRA et al., 2018).

Estes trabalhos descrevem inúmeros benefícios do exercício como diminuição do estresse oxidativo, modulação da resposta inflamatória, aumento da capacidade de exercício e da força muscular, sendo estes os pontos que nos pautaram a estudar esses efeitos nos animais com SHP, visto ser esta uma doença também de perfil crônico e inflamatório. No entanto, os resultados que observamos não se assemelham aos descritos na literatura, pois o exercício físico, na sua forma mais completa e recomendada, com treinamento aeróbico e resistido, não amenizou os danos pulmonares e a inflamação pulmonar e sistêmica encontrada nos animais doentes. A possível razão para estes achados está na gravidade e na fisiopatologia desta síndrome, com comprometimento sistêmico (hepático, pulmonar, músculo-esquelético, metabólico) e evolução rápida, sem tratamentos medicamentosos que retardem sua evolução. Neste contexto, é plausível supor que a inflamação induzida pela ligadura do ducto biliar comum foi progressiva e sobrepujou os efeitos anti-inflamatórios induzidos pelo protocolo de exercício combinado empregado.

Da mesma forma, a diminuição dos níveis plasmáticos e pulmonares de citocinas pro-inflamatórias, como o TNF, o aumento de anti-inflamatórias, como IL-10, assim como a inibição na expressão de P2X7 (TOLEDO-ARRUDA et al., 2017; VIEIRA et al., 2011) foi a hipótese de ação do exercício sugerida neste trabalho. Observamos em nossos resultados que a SHP aumentou a concentração de citocinas pró-inflamatórias no LBA (IL-6) e no plasma (INF- γ , TNF, IL-2, IL-4 e IL-6), sem nenhum efeito protetor do protocolo de exercício, e que a concentração de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) permaneceu inalterada. E a possível razão para esses achados,

pode ser o estímulo constante para produção e liberação dessas citocinas que advém, primariamente, da lesão hepática.

No entanto, na análise de imuno-histoquímica, um ligeiro aumento da regulação de IL-10 no epitélio das vias aéreas e uma regulação negativa da expressão de P2X7 nos leucócitos do parênquima pulmonar foram observados. O P2X7 é um receptor de membrana amplamente envolvido na resposta imune e inflamatória, ativado pela presença de alta concentração de ATP (adenosina-trifosfato) e sua ativação leva a liberação de citocinas inflamatórias (DI VIRGILIO et al., 2017). A inibição da expressão de P2X7 em doenças crônicas como a SHP é desejável. Sendo assim, a regulação negativa de P2X7 que observamos é um resultado importante, sugerindo o efeito benéfico do treinamento combinado na inflamação pulmonar induzida pela SHP.

A ativação da cascata de coagulação extrínseca por meio da regulação positiva da atividade pró-coagulante do fator tecidual está envolvida na patogênese da lesão pulmonar aguda e crônica e pode contribuir para inflamação pulmonar (WANG et al., 2019). Em contraste, o inibidor do fator tecidual (TFPI) atua inibindo a cascata de coagulação e é liberado após a ativação endotelial sob diferentes estímulos, incluindo o exercício (LUPU et al., 1995). O exercício físico nos ratos com SHP aumentou a expressão de TFPI nas células epiteliais, sugerindo um efeito protetor do treinamento na inflamação pulmonar. Além disso, a SHP aumentou a expressão de TFPI nos leucócitos do parênquima pulmonar, que foi reduzida pelo exercício. Esses intrigantes resultados estão parcialmente de acordo com estudo que demonstrou que o exercício físico aumenta os níveis circulantes de TFPI em atletas saudáveis (ZADOW et al., 2018b). No entanto, outro estudo demonstrou que o exercício físico não altera a expressão de TFPI (ZADOW et al., 2018a). O efeito do fator tecidual e do TFPI na patogênese da SHP ainda precisa ser elucidado.

No entanto, mesmo com a não alteração dos danos mecânicos ao sistema respiratório e a manutenção da inflamação pulmonar e sistêmica, os animais doentes foram capazes de aumentar sua capacidade de exercício e força muscular em decorrência do protocolo de treinamento, resultado semelhante ao descrito por Aamann et al. (2018) que observaram aumento da força e do tamanho muscular dos membros posteriores em animais submetidos a LDBC, mesmo sem encontrar diminuição significativa nos níveis séricos de amônia. Desta forma, considerando-se os achados do presente estudo, juntamente com os descritos por Aamann et al (2018), é possível concluir que mesmo na presença de doença hepática grave e crônica, com importante comprometimento da função respiratória, os animais treinados respondem positivamente ao treinamento combinado, como demonstrado pela significativa melhora das suas capacidades máximas de exercício.

Estudos clínicos, em pacientes cirróticos, descrevem os benefícios do exercício aeróbico (ZENITH et al., 2014) e do treinamento combinado, aeróbico e resistido (ROMÁN et al., 2016), com aumento da tolerância ao esforço e da massa muscular, melhora dos sintomas de fadiga e da capacidade funcional, e diminuição da massa gorda e do risco de queda. Considerando que a prática de exercício físico pode ser realizada de forma segura por estes pacientes.

Ainda são poucos os estudos encontrados na literatura que avaliam o efeito do exercício físico, aeróbico e resistido, em doenças hepáticas graves, como a SHP, tanto na área clínica como experimental. No entanto, a gravidade das alterações musculares descritas em pacientes hepatopatas, assim como o comprometimento da qualidade de vida e a oneração dos gastos (VAN VUGT et al., 2017), exige que novas linhas de estudo sejam realizadas, em caráter emergencial, para embasar a prática clínica baseada em evidências científicas.

Este trabalho apresenta algumas limitações. Não realizamos controle da ingestão calórica dos animais e também não houve suplementação alimentar. Embora a avaliação nutricional e o suporte nutricional adequado para otimizar os ganhos em decorrência do exercício físico sejam de extrema relevância (DUARTE-ROJO et al. 2018), o objetivo deste trabalho foi avaliar puramente o efeito do exercício físico, sem considerar nenhuma outra intervenção para atingir tal objetivo.

Da mesma forma, é plausível supor que os animais apresentaram hipoxemia induzida pelo esforço durante o treinamento, já que, em repouso, se apresentam hipoxêmicos. Não realizamos suplementação de oxigênio durante os exercícios e mesmo assim, os animais toleraram o período de treinamento e aumentaram sua capacidade de exercício. No entanto, existe a possibilidade deste benefício ser ainda maior se essa suplementação tivesse ocorrido.

6.CONCLUSÃO

Diante do exposto, podemos concluir que o treinamento combinado, de moderada intensidade, aumentou a capacidade máxima de exercício e a força muscular dos animais doentes que realizaram o treinamento, mesmo não minimizando os desarranjos das propriedades mecânicas do sistema respiratório e a inflamação sistêmica causados pela SHP.

7.REFERÊNCIAS

AAMANN, L.; OCHOA-SANCHEZ, R.; OLIVEIRA, M.; TREMBLAY, M.; BÉMEUR, C.; DAM, G.; VILSTRUP, H.; AAGAARD, N.K.; ROSE, C. Progressive resistance training prevent loss of muscle mass and strength in bile ducts ligation rats. *Liver Int.* 2019, 39 (4): 676 – 683. doi: 10.1111/liv.13997

ABD EL-KADER, S.M.; AL-JIFFRI, O.H.; AL-SHREEF, F.M. Aerobic exercises alleviate symptoms of fatigue related to inflammatory cytokines in obese patients with type 2 diabetes. *Afri Health Sci.* 2015, 15 (4): 1142 – 1148. doi: 10.4314/ahs.v15i4.13.

ALBU, G.; HABRE, W.; FONTAO, F.; MOREL, D.R.; PETAK, F. The contribution of the pulmonary microvascular pressure in the maintenance of an open lung during mechanical ventilation. *Respir Physiol Neurobiol* 2007, 157 (2-3): 262 – 269.

ALVES, J.P.; NUNES, R.B.; STEFANI, G.P.; DAL LAGO, P. Resistance training improves hemodynamic functions, collagen deposition and inflammatory profiles: experimental model of heart failure. *Plos One* 2014, 9 (10): e110317. doi:10.1371/journal.pone.0110317.

AYATA, C.K.; GANAL, S.C.; HOCKENJOS, B.; WILLIM, K.; VIEIRA, R.P.; GRIMM, M.; ROBAYE, B.; BOEYNAEMS, J.M.; VIRGILIO, F.D.; PELLEGATTI, P.; DIEFENBACH, A.; IDZKO, M.; HASSELBLATT, P. Purinergic P2Y2 receptors promote neutrophil

infiltration and hepatocyte death in mice with acute liver injury, *Gastroenterology* 2021, 143: 1620–1629.e4. doi.org/10.1053/j.gastro.2012.08.049.

BATES, J.H.T.; IRVIN, C.G.; FARRÉ, R.; ZOLTÁN, H. Oscillation mechanics of the respiratory system. *Compr Physiol*. 2011, 1: 1233 – 1272.

BATES, J.M.T. *Lung Mechanics: An inverse modeling approach*. 1st ed. New York: Cambridge University Press, 2009. 220p.

BRABER, S.; VERHEIJDEN, K.A.T.; HENRICKS, P.A.J.; KRENEVELD, A.D.; FOLKERTS, G. A comparison of fixation methods on lung morphology in a murine model of emphysema. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 2010, 299: L843-L851. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00192.2010>

CARVALHO, A.R.; ZIN, W.A. Respiratory system dynamical mechanical properties modeling in time and frequency domain. *Biophys Rev* 2011, 3: 71 – 84. doi 10.1007/s12551-011-0048-5

CHANG, C-C.; WANG, S-S.; HSIEH, H-G.; LEE, W-S.; CHUANG, C-L.; LIN, H-C.; LEE, F-Y.; LEE, S-D.; HUANG, H-C. Rosuvastatin improves hepatopulmonary syndrome through inhibition of inflammatory angiogenesis of lung. *Clinical Science* 2015, 129: 449 – 460. doi: 10.1042/CS20140622.

CONTI, F.F.; BRITO, J.O.; BERNARDES, N.; DIAS, D.S.; MALFITANO, C.; MORRIS, M.; LLESUY, S.F.; IRIGOYEN, M-C.; DE ANGELIS, K. Positive effect of combined exercise training in a model of metabolic syndrome and menopause: autonomic,

inflammatory, and oxidative stress evaluations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2015, 309: R1532 – R1539. doi:10.1152/ajpregu.00076.2015

COSARDERELIOGLU, C.; COSAR, A.M.; GURAKAR, M.; DAGHER, N.N.; GURAKAR, A. Hepatopulmonary Syndrome and Liver Transplantation: A Recent Review of the Literature. *Journal of Clinical and Translational Hepatology* 2016, 4: 47 – 53.

DE, B.K.; DUTTA, D.; PAL, S.K.; GANGOPADHYAY, S.; BAKSI, S.D.; PANI, A. The role of garlic in hepatopulmonary syndrome: a randomized controlled trial. *Can J Gastroenterol* 2010, 24 (3): 183 – 188.

DI VIRGILIO, F.; DAL BEN, D.; SARTI, A.C.; GIULIANI, A.L.; FALZONI, S. The P2X7 receptor in infection and inflammation. *Immunity*. 2017, 47 (1): 15 – 31. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.020.

DUARTE-ROJO, A.; RUIZ-MARGÁIN, A.; MONTAÑO-LOZA, A.J.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, R.U.; FERRANDO, A.; KIM, W.R. Exercise and physical activity for patients with end-stage liver disease: improving functional status and sarcopenia while on the transplant waiting list. *Liver Transpl* 2018, 24 (1): 122 – 139. doi: 10.1002/lt.24958

ESHRAIGHIAN, A.; KAMYAB, A.A.; YOON, S.K. Pharmacological Treatment for Hepatopulmonary Syndrome. *Biomed Res Int* 2013: 10 pages. doi.org/10.1155/2013/670139.

FALLON, M.B.; ABRAMS, G.A.; MCGRATH, J.W.; HOU, Z.; LUO, B. Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol* 1997, 272: G779 – G784.

FALLON, M.B.; KROWKA, M.J.; BROWN, R.S.; TROTTER, J.F.; ZACKS, S.; ROBERTS, K.E.; SHAH, V.H.; KAPLOWITZ, N.; FORMAN, L.; WILLE, K.; KAWUT, S. Impact of Hepatopulmonary Syndrome on Quality of Life and Survival in Liver Transplant Candidates. *Gastroenterology* 2008, 135(4): 1168 – 1175. doi:10.1053/j.gastro.2008.06.038.

FAUSTINI-PEREIRA, J.L.; HOMERCHER-GALANT, L.; GARCIA, E.; BRANDÃO, A.B.M.; MARRONI, C.A. Exercise capacity of cirrhotic patients with hepatopulmonary syndrome. *Annals of Hepatology* 2015, 14 (3): 361 – 368.

FREEMAN, R.B.; GISH, R.G.; HARPER, A.; DAVIS, G.L.; VIERLING, J.; LIEBLEIN, G.K.; BLAZEK, J.; HUNTER, R.; PUNCH, J. Model for End-Stage Liver Disease (MELD) exception guidelines: Results and recommendations from the MELD exception study group and conference (MESSAGE) for the approval of patients who need liver transplantation with diseases not considered by the standard MELD formula. *Liver Transplantation* 2006, 12 (12): S128 – S136.

GAIO, E.; AMADO, V.; RANGEL, L.; HUANG, W.; STORCK, R.; MELO-SILVA, C.A. Levofloxacin decreased chest wall mechanical inhomogeneities and airway and

vascular remodeling in rats with induced hepatopulmonary syndrome. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2013, 189: 565 – 570. doi.org/10.1016/j.resp.2013.08.006.

GIBNEY, B.C.; WAGNER, W.L.; YSASI, A.B.; BELLE, J.M.; TSUDA, A.; ACKERMANN, M.; MENTZER, S.J. Structural and functional evidence for the scaffolding effect of alveolar blood vessels. *Exp Lung Res* 2017, 43 (9-10): 337 – 346. doi: 10.1080/01902148.2017.1368739

GRACE, J.A.; ANGUS, P.W. Hepatopulmonary syndrome: Update on recent advances in pathophysiology, investigation, and treatment. *J Gastroenterol Hepatol* 2013, 28: 213 – 219. doi:10.1111/jgh.12061

GUNDERSEN, H.; BENDTSEN, T.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F.; VESTERBY, A.; WEST, M. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988, 96: 379 – 394.

GUPTA, S.; FAUGHNAN, M.E.; LILLY, L.; HUTCHISON, S.; FOWLER, R.; BAYOUMI, A.M. Norfloxacin therapy for hepatopulmonary syndrome: a pilot randomized controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010, 8 (12): 1095 – 1098. doi: 10.1016/j.cgh.2010.08.011

HANTOS, Z.; DAROCZY, B.; SUKI, B.; NAGY, S.; FREDBERG, J.J. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Apply Physiol* 1992, 72: 168 – 178.

JORGE, M.L.M.P.; OLIVEIRA, V.N.; RESENDE, N.M.; PARAISO, L.F.; CALIXTO, A.; DINIZ, A.L.D.; RESENDE, E.S.; ROPELLE, E.R.; CARVALHEIRA, J.B.; ESPINDOLA, F.S.; JORGE, P.T.; GELONEZE, B. The effects of aerobic, resistance, and combined exercise on metabolic control, inflammatory markers, adipocytokines, and muscle insulin signaling in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism Clinical and Experimental* 2011, 60: 1244 – 1252.

KIANIFAR, H.R.; KHALESI, M.; MAHMOODI, E.; AGHAEI, M.A. Pentoxifylline in hepatopulmonary syndrome. *World J Gastroenterol* 2012, 18 (35): 4912 – 4916. doi:10.3748/wjg.v18.i35.4912

KIM, G.; KANG, S.H.; KIM, M.Y.; BAIK, S.K. Prognostic value of sarcopenia in patients with liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. *Plos One* 2017, 12 (10): e0186990. doi: 10.1371/journal.pone.0186990

KIM, W.R.; LAKE, J.R.; SMITH, J.M.; SKEANS, M.A.; SCHLADT, D.P.; EDWARDS, E.B.; HARPER, A.M.; WAINRIGHT, J.L.; SNYDER, J.J., ISRANIA.K.; KASISKE, B.L. OPTN/SRTS 2013 annual data report: liver. *Am J Transplant* 2015, 15 (suppl 2): 1 – 28.

KOCH, D.G.; FALLON, M.B. Hepatopulmonary syndrome. *Curr Opin Gastroenterol* 2014, 30 (3): 260 – 264. doi:10.1097/MOG.0000000000000067

LIN, S-Y.; CHEN, W-T.; LEE, F-Y.; HUANG, C-J.; SHEU, W.H-H. Activation of ubiquitin-proteasome pathway is involved in skeletal muscle wasting in a rat model with

biliary cirrhosis: potencial role of TNF- α . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005, 288 (3): E493 – 501.

LIU, Y.; LIU, S-X.; CAI, Y.; XIE, K-L.; ZHANG, W-L.; ZHENG, F. Effects of combined aerobic and resistance training on the glycolipid metabolism and inflammation levels in type 2 diabetes mellitus. *J Phys Ther Sci* 2015, 27: 2365 – 2371.

LUPU, C.; LUPU, F.; DENNEHY, U.; KAKKAR, V.V.; SCULLY, M.F. Thrombin induces the redistribution and acute release of tissue factor pathway inhibitor from specific granules within human endothelial cells in culture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995, 15 (11) 2055–2062. doi.org/10.1161/01.atv.15.11.2055.

MAHARSHI, S.; SHARMA, B.C.; SRIVASTAVA, S. Malnutrition in cirrhosis increase morbidity and mortality. *J Gastroenterol Hepatol* 2015, 30: 1507 – 1513. doi:10.1111/jgh.12999

MARTINS, M.S.; FARINHA, J.B.; BENETTI, C.B.; COURTES, A.A.; DUARTE, T.; SILVA, J.C.N.; DUARTE, M.M.M.F.; SOARES, F.A.A.; SANTOS, D.L. Positive effects of resistance training on inflammatory parameters in men with metabolic syndrome risk factors. *Nutr Hosp* 2015, 32(2): 792 – 798.

MELO-SILVA, C.A.; GAIO, E.; TREVIZOLI, J.E.; SOUZA, C.S.; GONÇALVES, A.S.; SOUSA, G.C.C.; TAKANO, G.; TAVARES, P. AMADO, V.M. Respiratory mechanics and lung tissue remodeling in a hepatopulmonary syndrome rat model. *Resp Physiol Neurobiol* 2011, 179: 326 – 333.

MENON, M.K.; HOUCHEN, L.; SINGH, S.J.; MORGAN, M.D.; BRADDING, P.; STEINER, M.C. Inflammatory and satellite cells in the quadriceps of patients with COPD and response to resistance training. *Chest* 2012, 142 (5): 1134 – 1142.

MIYAMOTO, A.; KATSUTA, Y.; ZHANG, X-J.; LI, H-L.; MASARU, O.; KOMEICHI, H.; SHIMIZU, S.; AKIMOTO, T.; MIZUNO, K. Effect of chronic methylene blue administration on hypoxemia in rats with common bile duct ligation. *Hepatol Res* 2010, 40: 622 – 632. doi: 10.1111/j.1872-034X.2010.00640.x

MONTANO-LOZA, A.J.; MEZA-JUNCO, J.; BARACOS, V.E.; PRADO, C.M.M.; MA, M.; MEEBERG, G.; BEAUMONT, C.; TANDON, P.; ESFANDIARI, N.; SAWYER, M.B.; KNETEMAN, N. Severe muscle depletion predicts postoperative length of stay but is not associated with survival after liver transplantation. *Liver Transpl* 2014, 20 (6): 640 – 648. doi 10.1002/lt.23863

NACIF, L.S.; ANDRAUS, W.; PINHEIRO, R.S.; DUCATTI, L.; HADDAD, L.B.P.; D'ALBUQUERQUE, L.C. The hepatopulmonary syndrome. *Arq Bras Cir Dig* 2014, 27(2):145 – 147.

NASCIMENTO, E.S.P.; SAMPAIO, L.M.M.; PEIXOTO-SOUZA, F.S.; DIAS, F.D.; GOMES, E.L.F.D.; GREIFFO, F.R.; OLIVEIRA, A.P.L.; STIRBULOV, R.; VIEIRA, R.P.; COSTA, D. Home-based pulmonary rehabilitation improves clinical features and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2015, 10: 645 – 653. doi: 10.2147/COPD.S76216

NISHIKAWA, H.; ENOMOTO, H.; HISHII, A.; IWATA, Y.; MIYAMOTO, Y.; ISHII, N.; YURI, Y.; HASEGAWA, K.; NAKANO, C.; NISHIMURA, T.; YOH, K.; AIZAWA, N.; SAKAI, Y.; IKEDA, N.; TAKASHIMA, T.; TAKATA, R.; IJIMA, H.; NISHIGUCHI, S. Elevated serum myostatin level is associated with worse survival in patients with liver cirrhosis. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2017, 8 (6): 915 – 925. doi: 10.1002/jcsm.12212

OGAWA, K.; SANADA, K.; MACHIDA, S.; OKUTSU, M.; SUZUKI, K. Resistance exercise training-induced muscle hypertrophy was associated with reduction of inflammatory markers in elderly women. *Mediators Inflamm* 2010: 1 – 7. doi:10.1155/2010/171023

OLIVO, C.R.; MIYAJI, E.N.; OLIVEIRA, M.L.S.; ALMEIDA, F.M.; LOURENÇO, J.D.; ABREU, R.M.; ARANTES, P.M.M.; LOPES, F.D.T.Q.S.; MARTINS, M.A. Aerobic exercise attenuates pulmonary inflammation induced by *Streptococcus pneumoniae*. *J Appl Physiol* 2014, 117: 998 – 1007. doi:10.1152/jappphysiol.00290.2014

PASCASIO, J.M.; GRILO, I.; LÓPEZ-PARDO, F.J.; ORTEGA-RUIZ, F.; TIRADOS, J.L.; SOUSA, J.M.; RODRIGUEZ-PURA, M.J.; FERRER, M.T.; SAYAGO, M.; GÓMEZ-BRAVO, M.A.; GRILO, A. Prevalence and severity of hepatopulmonary syndrome and its influence on survival in cirrhotic patients evaluated for liver transplantation. *Am J Transplant* 2014; 14: 1391 – 1399. doi: 10.1111/ajt.12713

PEDERSEN, B.K.; SALTIN, B. Exercise as medicine – evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand J Med Sci Sports* 2015, (Suppl. 3) 25: 1 – 72. doi: 10.1111/sms.12581

PETAK, F.; BABIK, B.; HANTOS, Z.; MOREL, D.R.; PACHE, J-C.; BILTON, C.; SUKI, B.; HABRE, W. Impact of microvascular circulation on peripheral lung stability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, 287: L879 – L889. doi: 10.1152/ajplung.00263.2003

RABILLER, A.; NUNES, H.; LEBREC, D.; TAZI, K.A.; WARTSKI, M.; DULMET, E.; LIBERT, J-M.; MOUGEOT, C.; MOREAU, R.; MAZMANIAN, M., HUMBERT, M., HERVÉ, P. Prevention of gram-negative translocation reduces the severity of hepatopulmonary syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 166: 514 – 517. doi: 10.1164/rccm.200201-027OC

RAEVENS, S.; FALLON, M.B. Potencial clinical targets in hepatopulmonary syndrome: lessons from experimental models. *Hepatology* 2018. doi: 10.1002/hep.30079

RAMOS-BARBÓN, D.; PRESLEY, J.F.; HAMID, Q.A.; FIXMAN, E.D.; MARTIN, J.G. Antigen-specific CD4+ T cells drive airway smooth muscle remodeling in experimental asthma. *J. Clin. Invest.* 2005, 115: 1580–1589. doi.org/10.1172/jci19711.

REIS GONÇALVES, C.T.; REIS GONÇALVES, C.G.; ALMEIDA, F.M.; LOPES, F.D.T.Q.S.; DURÃO, A.C.C.S.; SANTOS, F.A.; SILVA, L.F.F.; MARCOURAKIS, T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; VIEIRA, R.P.; DOLHNIKOFF, M. Protective effects of

aerobic exercise on acute lung injury induced by LPS in mice. *Crit Care* 2012, 16 (5): R199. doi: 10.1186/cc11807

RIGONATO-OLIVEIRA, N.C.; MACKENZIE, B.; BACHI, A.L.L.; OLIVEIRA-JUNIOR, M.C.; SANTOS-DIAS, A.; BRANDAO-RANGEL, M.A.; DELLE, H.; COSTA-GUIMARAES, T.; DAMACENO-RODRIGUES, N.R.; DULLEY, L.H.; BENETTI, M.A.; MALFITANO, C.; DE ANGELIS, K.; ALBERTINI, R.; OLIVEIRA, A.P.L.; ABBASIS, A.; NORTHOFF, H.; VIEIRA, R.P. Aerobic exercise inhibits acute lung injury: from mouse to human evidence exercise reduced lung injury markers in mouse and cells. *Exerc Immunol Rev* 2018, 24: 36 – 44.

RODRIGUES, B.; FIGUEROA, D.M.; MOSTARDA, C.T.; HEEREN M.V.; IRIGOYEN, M.C.; DE ANGELIS, K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovascular Diabetology* 2007, 6 (38): 1 – 7.

RODRIGUEZ-ROISIN, R.; KROWKA, M.J. Hepatopulmonary Syndrome – A liver-induced lung vascular disorder. *N Engl J Med* 2008, 358 (22): 2378 – 2387.

RODRÍGUEZ-ROISIN, R.; KROWKA, M.J. HERVÉ, P.; FALLON, M.B.; ERS Task Force Pulmonary-Hepatic Vascular Disorders (PHD) Scientific Committee. Pulmonary-Hepatic Vascular Disorders (PHD). *Eur Resp J* 2004, 24 (5): 861 – 880. doi: 10.1183/09031936.04.00010904

ROMÁN, E.; GARCÍA-GALCERÁN, C.; TORRADES, T.; HERRERA, S.; MARÍN, A.; DONATE, M.; ALVARADO-TAPIAS, E.; MALOUF, J.; NÁCHER, L.; SERRA-GRIMAS, R.; GUARNER, C.; CORDOBA, J.; SORIANO, G. Effects of an exercise programme on functional capacity, body composition and risk of fall in patients with cirrhosis: a randomized clinical trial. *Plos One* 2016, 11 (3): e0151652. doi:10.1371/journal.pone.0151652

SANCHES, I.C.; CONTI, F.F.; BERNARDES, N.; BRITO, J.O.; GALDINI, E.G.; CAVAGLIERI, C.R.; IRIGOYEN, M-C.; DE ANGELIS, K. Impact of combined exercise training on cardiovascular autonomic control and mortality in diabetic ovariectomized rats. *J Appl Physiol* 2015, 119: 656 – 662. doi:10.1152/jappphysiol.00883.2014

SANCHES, I.C.; CONTI, F.F.; SARTORI, M.; IRIGOYEN, M.C.; DE ANGELIS, K. Standardization of resistance exercise training: effects in diabetic ovariectomized rats. *Int J Sports Med* 2014, 35: 323 – 329.

SANI, M.N.; KIANIFAR, H.R.; KIANEE, A.; KHATAMI, G. Effect of oral garlic on arterial oxygen pressure in children with hepatopulmonary syndrome. *World J Gastroenterol* 2006, 12 (15): 2427 – 2431.

SCHENK, P.; FUHRMANN, V.; MADL, C.; FUNK, G.; LEHR, S.; KANDEL, O.; MÜLLER, C. Hepatopulmonary syndrome: prevalence and predictive value of various cut offs for arterial oxygenation and their clinical consequences. *Gut* 2002, 51: 853 – 859.

SCHENK, P.; MADL, C.; REZAIIE-MAJD, S.; LEHR, S.; MÜLLER, C. Methylene blue improves the hepatopulmonary syndrome. *Ann Intern Med* 2000,133: 701 – 706.

SILVA, R.A.; ALMEIDA F.M.; OLIVO, C.R.; SARAIVA-ROMANHOLO, B.M.; MARTINS, M.A.; CARVALHO, C.R.F. Exercise reverses OVA-induced inhibition of glucocorticoid receptor and increases anti-inflammatory cytokines in asthma. *Scand J Med Sci Sports* 2016, 26: 82 – 92. doi: 10.1111/sms.12411.

SILVA, R.A; VIEIRA, R.P.; DUARTE, A.C.S.; LOPES, F.D.T.Q.S.; PERINI, A.; MAUAD, T.; MARTINS, M.A.; CARVALHO, C.R.F. Aerobic training reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. *Eur Respir J* 2010, 35 (5): 994 – 1002.

SINCLAIR, M.; GOW, P.J.; GROSSMANN, M.; ANGUS, P.W. Review article: sarcopenia in cirrhosis – aetiology, implications and potential therapeutic interventions. *Aliment Pharmacol Ther* 2016, 43: 765 – 777. doi:10.1111/apt.13549

SUK, K.T.; KIM, M.Y.; JEONG, S.W.; JANG, J.Y.; JANG, Y.O.; BAIK, S.K. Impact of bacterial translocation on hepatopulmonary syndrome: a prospective observational study. *Dig Dis Sci*. 2018, 63 (1): 248 – 256. doi: 10.1007/s10620-017-4868-4

SWANSON, K.L.; WIESNER, R.H.; KROWKA, M.J. Natural history of hepatopulmonary syndrome: impact of liver transplantation. *Hepatology* 2005, 41 (5):1122 – 1129.

TANIKELLA, R.; PHILIPS, G.M.; FAULK, D.K.; KAWUT, S.M.; FALLON, M.B. Pilot study of pentoxifylline in hepatopulmonary syndrome. *Liver Transpl* 2008, 14 (8): 1199-1203. doi:10.1002/lt.21482

TOLEDO-ARRUDA, A.C.; VIEIRA, R.P.; GUARNIER, F.A.; SUEHIRO, C.L.; CALEMAN-NETO, A.; OLIVO, C.R.; ARANTES, P.M.; ALMEIDA, F.M.; LOPES, F.D.; RAMOS, E.M.; CECCHINI, R.; LIN, C.J.; MARTINS, M.A. Time-course effects of aerobic physical training in the prevention of cigarette smoke induced COPD. *J Appl Physiol* 2017, 123: 674 – 683. doi:10.1152/jappphysiol.00819.2016.

VAN VUGT, J.L.A.; BUETTNER, S.; ALFERINK, L.J.M.; BOSSCHE, N.; BRUIN, R.W.F.; MURADA, S.D.; POLAK, W.G.; METSELAAR, H.J.; IJZERMANS, J.N.M. Low skeletal muscle mass is associated with increased hospital costs in patients with cirrhosis listed for liver transplantation – a retrospective study. *Transpl Int* 2018, 31 (2): 165 – 174. doi: 10.1111/tri.13048

VIEIRA, R.P.; ANDRADE, V.F.; DUARTE, A.C.S; SANTOS, A.B.G.; MAUAD, T.; MARTINS, M.A.; DOLHNIKOFF, M.; CARVALHO, C.R.F. Aerobic conditioning and allergic pulmonary inflammation in mice. II. Effects on lung vascular and parenchymal inflammation and remodeling, *Am. J. Physiol.-Lung Cell.Mol.Physiol.* 2008, 295: L670–L679. doi.org/10.1152/ajplung.00465.2007.

VIEIRA, R.P.; TOLEDO, A.C.; FERREIRA, S.C.; SANTOS, A.B.G.; MEDEIROS, M.C.R.; HAGE, M.; MAUAD, T.; MARTINS, M.A.; DOLHNIKOFF, M.; CARVALHO, C.R.F. Airway epithelium mediates the anti-inflammatory effects of exercise on

asthma. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2011, 175: 383–389. doi.org/10.1016/j.resp.2011.01.002.

VIEIRA, R.P.; TOLEDO, A.C.; SILVA, L.B.; ALMEIDA, M.A.; DAMACENO-RODRIGUES, N.R.; CALDINI, E.G.; SANTOS, A.B.G.; RIVERO, D.H.; HIZUME, D.C.; LOPES, F.D.T.Q.S.; OLIVO, C.R.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; MARTINS, M.A.; SALDIVA, P.H.N.; DOLHNIKOFF, M. Anti-inflammatory effects of exercise in mice exposed to air pollution. *Med Sci Sports Exerc* 2012, 44: 1227 – 1234. doi: 10.1249/MSS.0b013e31824b2877

WANG, B.Q.; SHI, M.; ZHANG, J.P.; WU, X.; CHANG, M.J.; CHEN, Z.H.; SHEN, H.H.; SONG, Y.L.; ZHOU, J.; BAI, C.X. Knockdown of TFPI-anchored endothelial cells exacerbates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via NF- κ B signaling pathway. *Shock* 2019, 51: 235–246. doi.org/10.1097/shk.0000000000001120.

YANG, W.; HU, B.; WU, W.; BATRA, S.; BLACKBURN, M.R.; ALCORN, J.L.; FALLON, M.B.; ZHANG, J. Alveolar Type II Epithelial Cell Dysfunction in Rat Experimental hepatopulmonary Syndrome (HPS). *Plos One* 2014, 9 (11): e113451. doi:10.1371/journal.pone.0113451

ZADOW, E.K.; ADAMS, M.J.; WU, S.S.X.; KITIC, C.M.; SINGH, I.; KUNDUR, A.; BOST, N.; JOHNSTON, A.N.B.; CRILLY, J.; BULMER, A.C.; HALSON, S.L.; FELL, J.W. Compression socks and the effects on coagulation and fibrinolytic activation during marathon running. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2018a, 118: 2171–2177. doi.org/10.1007/s00421-018-3929-5.

ZADOW, E.K.; KITIC, C.M.; WU, S.S.X.; FELL, J.W.; ADAMS, M.J. Time of day and short-duration high-intensity exercise influences on coagulation and fibrinolysis. *Eur. J. Sport Sci.* 2018b, 18: 1–9. doi.org/10.1080/17461391.2017.1420237.

ZENITH, L.; MEENA, N.; RAMADI, A.; YAVARI, M.; HERVEY, A.; CARBONNEAU, M.; MA, M.; ABRALDES, J.G.; PATERSON, I.; HAYKOWSKY, M.J.; TANDON, P. Eight weeks of exercise training increase aerobic capacity and muscle mass and reduce fatigue in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014, 12 (11): 1920 – 1926.E2. doi: 10.1016/j.cgh.2014.04.016

ZHANG, J.; FALLON, M.B. Hepatopulmonary syndrome: update on pathogenesis and clinical features. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012, 9: 539 – 549. doi:10.1038/nrgastro.2012.123

ZHANG, J.; LING, Y.; TANG, L.; LUO, B.; CHACKO, B.K.; PATEL, R.P.; FALLON, M.B. Pentoxifylline attenuation of experimental hepatopulmonary syndrome. *J Appl Physiol* 2007, 102 (3): 949. doi:10.1152/jappphysiol.01048.2006

ZHANG, J.; LUO, B.; TANG, L.; WANG, Y.; STOCKARD, C.R.; KADISH, I.; GROEN, T.V.; GRIZZLE, W.E.; PONNAZHAGAN, S.; FALLON, M.B. Pulmonary angiogenesis in a rat model of hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 2009, 136 (3): 1070 – 1080. doi:10.1053/j.gastro.2008.12.001

ZHANG, Z-J.; YANG, C-Q. Progress in investigating the pathogenesis of hepatopulmonary syndrome. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010, 9 (4): 355 – 360.