



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

**ANA KARÊNINA DIAS DE ALMEIDA SABELA**

**AVALIAÇÃO DO MÚSCULO DIAFRAGMA EM RATOS COM INSUFICIÊNCIA  
CARDÍACA SUBMETIDOS À EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO: ESTUDO  
EXPERIMENTAL E REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE**

Presidente Prudente - SP  
2019

**ANA KARÊNINA DIAS DE ALMEIDA SABELA**

**AVALIAÇÃO DO MÚSCULO DIAFRAGMA EM RATOS COM INSUFICIÊNCIA  
CARDÍACA SUBMETIDOS À EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO: ESTUDO  
EXPERIMENTAL E REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE**

Tese apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia e Saúde Animal – Área de concentração: Fisiologia Animal.

Orientadora:  
Profa Dra. Francis Lopes Pacagnelli

616.129  
S115a

Sabela, Ana Karênina Dias de Almeida.

Avaliação do músculo diafragma em ratos com insuficiência cardíaca submetidos à exercício físico aeróbio: estudo experimental e revisão sistemática com meta-análise / Ana Karênina Dias de Almeida Sabela. – Presidente Prudente, 2019.

94f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal)  
- Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2019.

Bibliografia.

Orientador: Francis Lopes Pacagnelli

1. Insuficiência cardíaca. 2. Exercício físico 3. Estresse oxidativo. I. Título.

**ANA KARÊNINA DIAS DE ALMEIDA SABELA**

**AVALIAÇÃO DO MÚSCULO DIAFRAGMA EM RATOS COM INSUFICIÊNCIA  
CARDÍACA SUBMETIDOS À EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO: ESTUDO  
EXPERIMENTAL E REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE**

Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora - Área de Concentração: Fisiopatologia e Saúde Animal.

Presidente Prudente, 25 de Setembro de 2019.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Francis Lopes Pacagnelli (Orientadora)  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

---

Profa. Dra. Gabriela Andrade Piemonte Lopes  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

---

Prof. Dr. Luiz Carlos Marques Vanderlei  
Universidade Estadual Paulista – UNESP  
Presidente Prudente-SP

---

Profa. Dra. Marina Politi Okoshi  
Universidade Estadual Paulista – Unesp Botucatu  
Botucatu-SP

---

Profa. Dra. Silvia M. C. Franco Andrade  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a **Deus** que sempre esteve ao meu lado durante esta jornada, me abençoando e me fortalecendo para viver cada dia.

Ao meu filho **Rafael**, que é a maior alegria da minha vida e ao meu esposo **Gustavo** que juntos fazem minha vida melhor.

Aos meus pais, **Cleonice e Pésio** e meus sogros **Izabel e Nelson** por todo carinho e auxílio para que eu possa investir em minha profissão. A minha querida irmã **Islanda** e toda a minha família que sempre me apoiou e incentivou, meu carinho eterno.

Amo todos vocês!!!

## **AGRADECIMENTOS**

Aos amigos, pacientes e alunos que torceram pelo meu sucesso profissional.

Aos Docentes Profa. Dra. Marina Politi Okoshi; Prof. Dr. Antônio Carlos Cicogna, e Profa. Dra. Camila Correa pela parceria e por colaborarem para a realização deste trabalho. À Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, que deu todo apoio científico e tecnológico para a realização deste Doutorado.

Aos colegas de Botucatu que sempre me auxiliaram em tudo que precisei: Sérgio, Dijon, Vitor, Gustavo, Mariana, Aline, Thierres, Éder, Luana e Igor Deprá pelo apoio, conhecimento e por toda ajuda na parte experimental deste trabalho.

A toda a família das queridas Marília e Raquel por todas as vezes que me acolheram com todo carinho durante as minhas viagens à Botucatu e fizeram a saudade da família não ser tão difícil pelo prazer da companhia.

As minhas alunas de iniciação científica por todo auxílio e empenho: Giovana, Geovana, Janaina e Juliana. Tenho muito orgulho de vocês!!!

A todos que me auxiliaram para que aprendesse a realizar a meta-análise, Dr. Valter, Dra. Gabriela, Dr. Gabriel, Dr. Rogério, Dra. Giseli, vocês foram essenciais para a realização do segundo artigo.

Aos Docentes do Doutorado que compartilharam todo conhecimento que possuem de forma exemplar, contribuindo com a minha formação profissional. Aos colegas do Doutorado, em especial a Dayane e o Thaoan e aos profissionais da UNOESTE que ajudaram de alguma forma, com trabalhos, conhecimentos e até mesmo torcendo pelo término deste trabalho. As funcionárias da secretaria do doutorado, principalmente a Keid que sempre esteve pronta para me ajudar e orientar em todas as etapas desta jornada,

À UNOESTE, pela oportunidade do Doutorado, bem como toda a sua equipe de funcionários, que tornam esta universidade um lugar de respeito e exemplo.

À minha coordenadora Bruna Corral e aos meus queridos amigos docentes que estiveram sempre prontos demonstrando apoio, cuidados, orientações e profissionalismo dedicados durante toda esta jornada.

Agradeço pelo apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES, por permitirem o início da realização dessa conquista.

Agradeço em especial à minha querida orientadora Dra. Francis Lopes Pacagnelli pela competência ímpar nesta caminhada de orientações, por toda dedicação, ética, respeito, cobranças, conversas, incentivos, pela amizade, por confiar em meu trabalho, por contribuir de forma decisiva no meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada por me ajudar a me superar e me entender em momentos bons e ruins que fizeram parte desta jornada. Sempre que posso te digo que você é uma inspiração para mim. Obrigada por tudo!!!

A Banca examinadora por ter aceito o convite e ajudarem a melhorar o trabalho.

A todos os meus sinceros agradecimentos!

***“A ciência nunca resolve um problema  
sem criar pelo menos uns outros dez”.***

***George Bernard Shaw***



## RESUMO

### **Avaliação do músculo diafragma em ratos com insuficiência cardíaca submetidos à exercício físico aeróbio: estudo experimental e revisão sistemática com meta-análise**

A Insuficiência Cardíaca (IC) é um importante problema de saúde pública e uma das principais causas de hospitalizações e morte. Entre os sintomas destaca-se a dispneia, intolerância aos exercícios e piora da capacidade funcional. Alterações morfológicas, biomecânicas, enzimáticas e funcionais podem ser vistas na musculatura respiratória e podem atuar promovendo a disfunção diafragmática através da alteração da força muscular, que pode ocorrer devido aumento das do estresse oxidativo. O objetivo deste estudo foi investigar no músculo diafragma a influência do exercício aeróbio na força muscular, no estresse oxidativo e vias de sinalização do I $\kappa$ -B e NADPH. Foram utilizados 32 ratos Wistar macho, divididos em 4 grupos experimentais: Sham (controle); ShamExF (controle exercício aeróbio); EAo (estenose aórtica); EAoExF (estenose aórtica exercício aeróbio). Os animais realizaram um programa de exercício durante 5 dias/semana por 10 semanas. As alterações cardíacas foram avaliadas por ecocardiograma (18 e 28 semanas). No músculo diafragma a dosagem do estresse oxidativo foi mensurada por meio da Peroxidação Lipídica (MDA), Carbonilação Proteica, e a análise das Enzimas Antioxidantes foram feitas através da avaliação de Superóxido dismutase (SOD) e Catalase. Foi mensurado a análise da via I $\kappa$ -B pela expressão proteica de Western Blott e as subunidades via da NADPH (NOX2, NOX4, P22phox e P47phox) através da expressão gênica pela PCR-RT tempo real. Concomitantemente, foi realizado uma revisão sistemática com metanálise, que iniciou com pesquisa de palavras chaves em 3 bases de dados (Pubmed, Embase e Web of Science) para seleção dos estudos e analisar a força muscular diafragmática de ratos com insuficiência cardíaca submetidos ao exercício aeróbio. Foi avaliado o risco de viés através do Syrcle. Todas as fases foram feitas em duplicata. Ao final, foi feita a metanálise. Os resultados do ecocardiograma (28 semanas) demonstram diminuição de 11% tamanho do átrio (AE/PCF) nos animais EAoExF comparado com o EAo. Funcionalmente, os animais EAoExF apresentaram uma melhora na disfunção sistólica comparados com EAo, observado pela melhora da PEE% (menor 10%) e do VEPP (menor 22%). Foram observadas melhora no Índice Tei (maior 53%) e TDI's (menor 20%) evidenciando a melhor função cardíaca dos animais EAoExF comparados com EAo. As avaliações do estresse oxidativo, via I $\kappa$ -B e p-47phox não diferiram. Na expressão gênica do complexo NADPH oxidase a subunidade p22phox foi menor em 30% no grupo EAoExF que EAo. A expressão do Nox2 foi 27% menor no grupo EAoExF, comparado com o EAo. Houve diminuição de 36% do Nox4 no grupo EAoExF comparado EAo. Os resultados da metanálise demonstraram que o exercício aeróbio não favoreceu o ganho de força diafragmática. Diante do exposto concluímos que o protocolo de exercício físico aeróbio não influencia a força diafragmática, e nos ratos com IC devido estenose aórtica, o exercício foi capaz de minimizar as disfunções cardíacas e diminuir a geração das fontes de EROs do músculo diafragma.

**Palavras chaves:** Insuficiência Cardíaca, Exercício, Estresse Oxidativo.

## ABSTRACT

### **Evaluation of diaphragm muscle in rats with heart failure submitted to aerobic physical exercise: experimental study and systematic review with meta-analysis**

Heart Failure (HF) is a major public health problem and one of the leading causes of hospitalization and death. Symptoms include dyspnea, exercise intolerance, and worsening of functional capacity. Morphological, biomechanical, enzymatic and functional changes can be seen in the respiratory muscles and can act to promote diaphragmatic dysfunction through the alteration of muscle strength, which may occur due to an increase in oxidative stress. The objective of this study was to investigate in the diaphragm muscle the influence of aerobic exercise on muscle strength, oxidative stress and signaling pathways of I $\kappa$ -B and NADPH. Thirty-two male Wistar rats were divided into four experimental groups: Sham (control); ShamExF (aerobic exercise control); AoS (aortic stenosis); EAoExF (aerobic exercise aortic stenosis). The animals performed an exercise program for 5 days / week for 10 / weeks. Cardiac abnormalities were assessed by echocardiography (18 and 28 weeks). In the diaphragm muscle the oxidative stress dosage was measured by means of Lipid Peroxidation (MDA), Protein Carbonylation, and the analysis of Antioxidant Enzymes were done through Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase. I $\kappa$ -B pathway analysis by Western blot protein expression and the NADPH pathway subunits (NOX2, NOX4, P22phox and P47phox) were measured by gene expression by real-time RT-PCR. At the same time, a systematic review with meta-analysis was carried out, which began with a search for key words in 3 databases (Pubmed, Embase and Web of Science) for the selection of studies and to analyze the diaphragmatic muscle strength of rats with heart failure submitted to aerobic exercise. The risk of bias was assessed through Syrcle application. All phases were done in duplicate. At the end, the meta-analysis was done. The echocardiogram performed at 28 weeks demonstrated atrial size (LA/FBW) was 11% lower in AS-Ex animals compared to AS. Functionally, the animals in the AS-Ex group demonstrated improvement in systolic dysfunction compared AS, observed through 10% lower ESP% and 22% lower PWSS. Were observed in the Tei Index (53% higher) and TDI's (20% lower), evidencing the improvement in the cardiac function parameters of AS-Ex compared to AS. The results of oxidative stress evaluations via I $\kappa$ -B and p-47phox did not differ. In the gene expression of the NADPH oxidase complex the p22phox subunit was lower in 30.8% in the EAoExF group than in the EAo. The expression of Nox2 was 27.7% lower in the EAoExF group, compared to AoS. There was a 36.3% decrease in Nox4 in the EAoExF group compared to EAo. The results of the meta-analysis showed that aerobic exercise did not favor diaphragmatic strength gain. In view of the above, we concluded that the protocol of aerobic physical exercise does not influence diaphragmatic strength, and in rats with HF due to aortic stenosis, the exercise was able to minimize the cardiac dysfunction and the oxidative stress of the diaphragm muscle.

**Keywords:** Heart Failure, Exercise, Oxidative Stress.

## LISTA DE SIGLAS

% – Porcentagem

°C – Graus Célsius

$\mu\text{m}^2$  – Micrômetro Quadrado

ANOVA – Análise de Variância

AE/PCF – Átrio esquerdo / Peso corporal final

CAT – Catalase

cDNA – DNA complementar

comp – Comprimento

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

DDVE – Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo

E/A' – Razão entre picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial

EDPP – Espessura diastólica da parede posterior

EAO – Grupo estenose aórtica controle

EAOExF – Grupo estenose aórtica exercício aeróbio

G – Gramas

g/cm – Grama por centímetro

IKK – quinase IKK

IK-B – quinase IKB

Índice Tei: Índice de performance miocárdica

km/h – Quilômetro por Hora

Massa VE – Massa do ventrículo esquerdo

mg/kg – Miligrama por Quilo

mm/s – milissegundo

n – Tamanho da amostra

NaCl 9% – Solução salina

NADPH oxidase – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NF-kB – fator de transcrição NF kappa B

NOX – Subunidade catalítica de NADPH oxidases

$\text{O}_2^-$  – Radical Superóxido

PCF – Peso corporal final

PEE% – Porcentagem de encurtamento endocardial

RNA<sub>m</sub> – RNA mensageiro

RT-PCR – PCR Tempo Real

Sham – Grupo sedentário controle

ShamExF – Grupo controle exercício aeróbio

sem – Semanas

SOD – Superóxido Dismutase

TDI's – Velocidade sistólica anular mitral por imagem Doppler tecidual (média entre velocidade parede lateral e septal)

VD – Ventrículo Direito

VE – Ventrículo Esquerdo

VEPP – Velocidade de encurtamento da parede posterior

vs – Versus

WB – Western Blotting

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>ARTIGO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>ARTIGO REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE.....</b>	<b>44</b>
<b>ANEXO A</b>	<b>NORMAS DA REVISTA DO ARTIGO EXPERIMENTAL (EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY).....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO B</b>	<b>NORMAS DA REVISTA DO ARTIGO REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE.....</b>	<b>78</b>

## 1 ARTIGO EXPERIMENTAL

**Efeitos benéficos do exercício físico no estresse oxidativo do músculo diafragma em ratos com insuficiência cardíaca induzida por estenose aórtica**

**Beneficial effects of physical exercise on oxidative stress of muscle diaphragm in rats with heart failure induced by aortic stenosis**

### **Informação adicional:**

Título resumido: Benefícios diafragmático do exercício físico na insuficiência cardíaca

Palavras-chave: Insuficiência cardíaca, Diafragma, estresse oxidativo

Número total de palavras: 4.155

Número total de referências: 33

Ana Karênina Dias de Almeida Sabela<sup>1</sup>, Dijon Henrique Salomé Campos<sup>2</sup>, Gustavo Augusto Ferreira Mota<sup>2</sup>, Sérgio Luiz Borges de Souza<sup>2</sup>, Vitor Loureiro da Silva<sup>2</sup>, Aline Regina Ruiz Lima<sup>2</sup>, Mariana Janini Gomes<sup>2</sup>, Marianna Rabelo de Carvalho<sup>3</sup>, Camila Renata Corrêa<sup>2</sup>, Antônio Carlos Cicogna<sup>2</sup>, Marina Politi Okoshi<sup>2</sup>, Francis Lopes Pacagnelli<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento Fisioterapia, UNOESTE - Presidente Prudente - Brasil.

<sup>2</sup>Departamento Clínica Médica, Faculdade Medicina, UNESP - Botucatu - Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS - Campo Grande -Brasil.

<sup>4</sup>Programa Pós Graduação: Ciência Animal, UNOESTE-Presidente Prudente-Brasil.

**Correspondência:** Francis Lopes Pacagnelli, Universidade do Oeste Paulista-Unoeste, Rodovia Raposo Tavares, km572, Bairro Limoeiro, Presidente Prudente-SP-Brasil. CEP:19.067-175. Telefone:(018)3229-2000.

## **NEW FINDINGS**

### **Qual a questão central deste estudo?**

A Insuficiência cardíaca favorece alterações cardíacas, sistêmicas e no músculo esquelético. Este estudo analisou a influência do exercício aeróbio no músculo diafragma na estenose aórtica e avaliou as vias geradoras de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo, esta relação não foi abordado anteriormente.

### **Qual o principal achado e sua importância?**

Observamos que o exercício aeróbio na insuficiência cardíaca causada por estenose aórtica atuou de maneira favorável à geração de espécies reativas de oxigênio na via NADPH oxidase, demonstrando que esta conduta é eficaz no combate a miopatia deste importante músculo.

## RESUMO

A Insuficiência Cardíaca (IC) é um importante problema de saúde pública, estima-se que em 2030 sua prevalência seja 25% maior. Um dos fatores que podem atuar promovendo a disfunção diafragmática na IC é o aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), favorecendo o estresse oxidativo. Foram utilizados ratos Wistar macho, divididos em 4 grupos (todos n=8): Sham; Sham exercício; EAo (Estenose aórtica); EAoExF (estenose aórtica exercício) que realizaram programa de Exercício Físico Aeróbio (ExF) 5 dias/semana, 10/semanas. No músculo diafragma foi realizado dosagem do estresse oxidativo e enzimas antioxidantes, via Ik-B e via NADPH oxidase. Os resultados do ecocardiograma com 28 semanas demonstram diminuição de 11% tamanho do átrio (AE/PCF) nos animais EAoExF comparado com o EAo. Funcionalmente, os animais EAoExF apresentaram uma melhora na disfunção sistólica comparados com EAo, observado pela melhora da PEE% menor 10% e do VEPP menor 22%. Foram observadas melhora no Índice Tei (maior 53%) e TDI's (menor 20%) evidenciando a melhor função cardíaca dos animais EAoExF comparados com EAo. Os resultados das avaliações do estresse oxidativo, via IK-B e p-47phox não diferiram. Na expressão gênica do complexo NADPH oxidase a subunidade p22phox foi menor em 30,8% no grupo EaoExF que EAo. A expressão do Nox2 foi 27,7% menor no grupo EAoExF, comparado com o EAo. Houve diminuição de 36,3% do Nox4 no grupo EAoExF comparado EAo. Conclui-se que o protocolo de ExF nos ratos com EAo foi capaz de atenuar a disfunção cardíaca e o estresse oxidativo do músculo diafragma.

**Palavras chaves:** Insuficiência Cardíaca, Diafragma, Exercício



## ABSTRACT

Heart Failure is an important public health problem, it is estimated that by 2030 its prevalence is 25% higher. One of the factors that may act to promote diaphragmatic dysfunction in HF is the increase of reactive oxygen species (ROS), favoring oxidative stress. Male Wistar rats were divided into 4 groups (all n=8): Control (C); Control exercise (C-Ex); AS (aortic stenosis); AS-Ex (aortic stenosis exercise) who performed an Aerobic Physical Exercise program (Ex) 5 days/week, for 10/weeks. In the diaphragm muscle, oxidative stress and antioxidant enzymes were measured, via I $\kappa$ -B and via NADPH oxidase. The echocardiogram performed at 28 weeks demonstrated atrial size (LA/FBW) was 11% lower in AS-Ex animals compared to AS. Functionally, the animals in the AS-Ex group demonstrated improvement in systolic dysfunction compared AS, observed through 10% lower ESP% and 22% lower PWSS. Were observed in the Tei Index (53% higher) and TDI's (20% lower), evidencing the improvement in the cardiac function parameters of AS-Ex compared to AS. The results of oxidative stress evaluations via I $\kappa$ -B and p-47phox did not differ. In the gene expression of the NADPH oxidase complex the p22phox subunit was lower in 30.8% in the AS-Ex group than in the AS. The expression of Nox2 was 27.7% lower in the AS-Ex group, compared to AS. There was a 36.3% decrease in Nox4 in the AS-Ex group compared to AS. It was concluded that the ExF protocol in rats with AS was able to attenuate the cardiac dysfunction and the oxidative stress of the diaphragm muscle.

**Keywords:** Heart Failure, Diaphragm, Exercise

## INTRODUÇÃO

A Insuficiência Cardíaca (IC) é um problema de saúde pública, com alta prevalência devido aumento da idade da população e melhoria nos tratamentos, favorecendo aumento de hospitalizações e conseqüentemente os custos com saúde (Savarese & Lund, 2017) . As alterações clínicas mais relevante são incapacidade ao exercício físico devido a fadiga e dispneia (Mangner et al., 2015; Martinez et al., 2015). Alterações no músculo diafragma na IC variam de acordo com estágio da patologia, e estão relacionados com piora da função contrátil, mudanças na distribuição dos tipos de fibras, na qualidade e quantidade das proteínas, alteração da pressão inspiratória máxima, redução da complacência pulmonar e estresse oxidativo (Kelley & Ferreira, 2017).

Tem-se destacado como uma importante fonte geradora de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) a via do complexo NADPH oxidase, em que no músculo esquelético encontra-se expressas três isoformas (NOX1, NOX2 e NOX4), que diferenciam-se entre si devido sua ativação (Ferreira & Laitano, 2016). No músculo diafragma este complexo atua piorando a função contrátil (Ahn, Beharry, Frye, Judge, & Ferreira, 2015; Ahn et al., 2016).

Dentre as vias que estimulam as fontes produtoras de estresse oxidativo destaca-se NF- $\kappa$ B e seu inibidor (IK-B) (Martinez et al., 2016). Estudo em ratos com IC mostrou no músculo sóleo o aumento do estresse oxidativo com produção malondialdeído (MDA), estimulado pelo aumento NF- $\kappa$ B (Martinez et al., 2016).

O exercício físico aeróbio (ExF) tem sido eficaz no equilíbrio entre a níveis oxidantes e antioxidantes no organismo (Gomes et al., 2017). Em estudo experimental observou que a atividade de enzimas antioxidantes ficou reduzida no

músculo esquelético (sóleo) durante IC, e que o ExF é uma conduta importante no combate ao estresse oxidativo (Martinez et al., 2015).

Dentre as estratégias terapêuticas para disfunção do músculo diafragma na IC destaca-se o exercício aeróbio na prevenção de perda de força diafragmática. Entretanto, este tipo de exercício não previne alterações morfológicas da junção neuro muscular e também está relacionado com deterioração da função inspiratória devido a um maior recrutamento de fibras IIX/b (de Souza et al., 2015). Devido aos resultados controversos, investigar o exercício aeróbio na transição da disfunção cardíaca para IC na estenose aórtica e compreender a relação com as EROs e o estresse oxidativo é importante para definir conduta terapêutica eficaz nesta condição.

Devido ao fato das vias de sinalização NADPH oxidase e IK-B terem influência com o estresse oxidativo no músculo diafragma, acredita-se que o ExF possa atenuar essas disfunções em ratos com Estenose Aórtica (EAo). Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência do ExF no diafragma de ratos com EAo no estresse oxidativo, nas vias NADPH oxidase e via IK-B.

## **MÉTODOS**

### **Modelo de Animais e Aprovação Ética**

Este trabalho foi devidamente cadastrado e aprovado pela Universidade Estadual Paulista-UNESP, Botucatu, com o protocolo CEUA nº: 1138-2015. Os experimentos foram realizados conforme: *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council)* e seguiram as recomendações do ARRIVE (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 2011; Kilkenney, Browne, Cuthill,

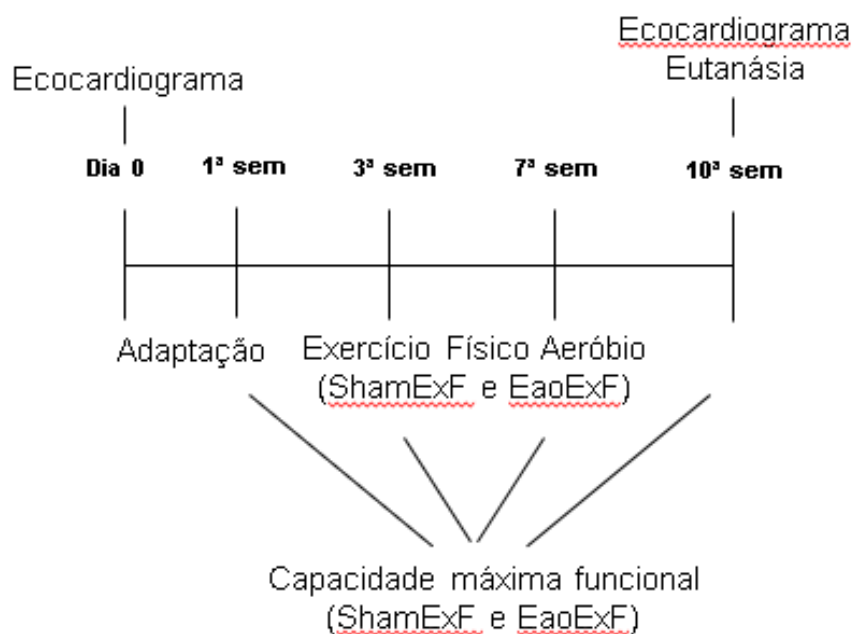
Emerson, & Altman, 2010). Foram utilizados 32 ratos Wistar machos, com 21 dias, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista-UNESP, Botucatu-Brasil. Os animais foram alojados em caixas coletivas de polipropileno com tampas de arame cromado, acolchoada com maravalha de Pinus esterilizada (mantendo 4 animais por caixa), em condições idênticas, permaneceram em um ciclo invertido (12-12hrs claro/escuro) e a oferta de água e ração foi *ad libitum*. O período experimental foi assistido por um médico veterinário responsável pelo biotério.

Os animais com 21 dias foram randomizados em dois grupos: Sham=16 (controle) e EAo=51 (estenose aórtica). Após 18 semanas os animais foram randomizados em quatro grupos experimentais: Sham=8 (controle sedentário); ShamExF=8 (controle exercício aeróbio); EAo=8 (estenose aórtica sedentário); EAoExF=8 (estenose aórtica exercício aeróbio).

Os animais com três a quatro semanas de vida (peso corporal entre 70 a 90 gramas) foram anestesiados com cloridrato de ketamina (60 mg/kg/ip Dopalen®, Sespo, Jacareí, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip Anasedan®, Sespo, Jacareí, São Paulo, Brasil) via intraperitoneal e submetidos à cirurgia de toracotomia mediana, com dissecação da aorta ascendente e colocação de um clipe de prata, com 0,6 mm de diâmetro interno, aproximadamente a 3 mm da sua raiz. A parede torácica foi fechada utilizando-se fio mononylon 5.0 para suturar as estruturas da parede. Durante a cirurgia, os animais foram ventilados manualmente por pressão positiva com oxigênio a 100%. Os animais do grupo Sham foram submetidos à mesma cirurgia, com excessão da colocação do clipe. Todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo pesquisador, especialista neste procedimento. Ao final da cirurgia, os ratos receberam solução isotônica (2 ml/kg,

Soro fisiológico®, ADV Farma, Nova Odessa, São Paulo, Brasil) aquecido, por via subcutânea e foram colocados em superfície aquecida até retornarem da anestesia. Após os efeitos do anestésico os animais foram medicados com Metamizol Sódico® (30 mg/kg), Biovet, Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil) via oral. O pós-operatório consistiu na limpeza das gaiolas, administração de antibiótico e analgésico, e antissepsia da ferida cirúrgica com Digliconato de Clorexidina 1% (10mg/ml, Riohex 1%®, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) diariamente, durante 5 dias (Bregagnollo et al., 2007).

O ExF envolveu um programa de corrida realizado em esteira rolante para ratos (Insight Instrumentos-Brasil), 5x/semana, por 10/semanas. Foi realizada 1 semana de adaptação com velocidade 5m/min/7dias. Posteriormente, os animais realizaram avaliação da capacidade máxima funcional realizada até a exaustão, ao início da primeira e finais das semanas 3, 7 e 10 (Pacagnelli et al., 2016). A velocidade máxima de corrida foi registrada e distância total percorrida calculada (Fig.1). Os ratos dos grupos ShamExF e EAoExF participaram de um programa de ExF a 50% da capacidade máxima de corrida com progressão gradual do tempo da 1ª a 6ª semana (10-20min).



**Figura 1:** Protocolo de Exercício Aeróbio. ShamExF: controle exercício físico; EAoExF: estenose aórtica exercício físico; sem: semanas

### Avaliação Estrutural e Funcional cardíaca pelo ecocardiograma

As estruturas cardíacas e a função ventricular esquerda foram avaliadas por ecocardiograma transtorácico nos ratos com 18 e 28 semanas. O avaliador foi uma médica cardiologista com especialidade em ecocardiografia e as análises foram cegas em relação ao treinamento. Para a realização do exame, os ratos foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip) e posicionados em decúbito lateral esquerdo. Foi utilizado ecocardiógrafo modelo Vivid S6 (General Electric Medical Systems, Tirat Carmel, Israel), equipado com transdutor eletrônico de 12 MHz. O exame foi realizado utilizando equipamento General Electric Medical Systems, (Vivid S6, Tirat Carmel-Israel), dotado de transdutor multifrequencial de 5-11,5MHz. A avaliação dos fluxos transvalvar mitral e aórtico foram realizadas com transdutor em 5,0MHz. As variáveis morfológicas e

funcionais do coração foram obtidas (Gomes et al., 2016). As estruturas cardíacas foram medidas manualmente, de acordo com American Society of Echocardiography e mensuradas em pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos. Foram avaliados: diâmetro diastólico (DDVE) ventrículo esquerdo (VE); espessura diastólica (EDPP) da parede posterior VE; átrio esquerdo (AE); massa VE. A espessura relativa da parede posterior VE foi calculada como  $2 \times EDPP / DDVE$ . A função sistólica VE foi avaliada pelos índices: porcentagem do encurtamento endocárdico (PEE%); calculado índice de performance miocárdica VE, índice Tei; velocidade inicial anular mitral por imagem Doppler de tecido (TDI). A função diastólica VE pelos índices: razão dos picos velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e contração atrial (onda A) do fluxo transmitral (Pagan et al., 2015).

### **Parâmetros anatômicos e coleta da musculatura esquelética**

No dia posterior ao ecocardiograma final os animais foram pesados, anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg) e eutanasiados por decapitação. Os átrios, ventrículo direito (VD), VE, incluindo septo, e o músculo diafragma foram dissecados e pesados. Fragmentos de pulmão e fígado foram desidratados para avaliar a congestão tecidual. A tíbia foi dissecada para normalização dos valores anatômicos. O músculo diafragma foi dissecado e congelado para posteriores análises (Carvalho et al., 2010).

### **Avaliação do Estresse Oxidativo**

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi medida pela inibição da reação radical superóxido com pirogalol, com valores de absorbância em 420nm. A

catalase foi avaliada pela diminuição nos níveis de peróxido de hidrogênio, com valores de absorvância a 240nm. A atividade é expressa como pmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduzida/min/mg de proteína. Os valores para as atividades enzimáticas foram corrigidos pelo teor de proteína. A proteína foi quantificada no método Lowry, utilizando albumina de soro bovino como padrão (dos Santos et al., 2018).

Os resultados finais da atividade da Peroxidação Lipídica (MDA) e Carbonilação Proteica foram corrigidos através dosagem de proteínas totais (mensuradas pelo método Bradford). O MDA reage com o TBA, por ser reativa ao TBA (TBARS), na forma 1:2 MDA-TBA, que é absorvida a 532nm. Assim, TBARS é proporcional a quantidade de MDA, sendo expressa em nmol/mg proteína. A Carbonilação foi mensurada utilizando método quantitativo inespecífico, que consiste na utilização do derivatizador 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) e detecção espectrofotométrica. As concentrações proteicas carboniladas foram expressas: nmol de DNPH/mg proteína (Samarghandian, Farkhondeh, Samini, & Borji, 2016). As avaliações foram feitas por uma bioquímica especialista em análise do estresse oxidativo de forma cega.

### **Avaliação da expressão gênica: RT-PCR em tempo real**

A expressão gênica das subunidades NADPH oxidase (NOX2, NOX4, p22phox e p47phox) e referência à ciclofilina foram analisadas por RT-PCR (Martinez et al., 2010). O TotalRNA foi extraído com Reagente TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad-EUA) e tratado com DNase I (Invitrogen Life Technologies). Um micrograma de RNA foi sujeito a transcrição reversa utilizando Kit de Transcrição Reversa ADNc de Alta Capacidade, conforme métodos padrão (Applied Biosystems, Foster City-EUA). Alíquotas de cDNA foram então submetidas à reação



de PCR-RT utilizando-se ensaios personalizados contendo "primers" sense e antisense e sondas Taqman (Applied Biosystems, Foster City-EUA) específicas para cada gene: NOX2 (Rn00576710m1), NOX4 (Rn00585380m1), p22phox (Rn00577357m1) e p47phox (Rn00586945m1). A amplificação e análise foram realizadas utilizando o sistema de PCR-RT Step One Plus™ (Applied Biosystems, Foster City-EUA). A expressão dos dados foi normalizada pela ciclofilina (Rn00690933m1). As reações foram realizadas em triplicata e os níveis de expressão calculados usando o método comparativo CT ( $2^{-\Delta CT}$ ) (Lima-Leopoldo et al., 2013). As avaliações foram feitas por um biólogo especialista em análises moleculares de forma cega.

#### **Avaliação da expressão proteica: Western Blotting**

Os níveis de proteína foram analisados por Western blotting utilizando antígenos específicos IK-B (IK-B- $\alpha$  sc-1643), e p-IK-B (p-IK-B- $\alpha$  sc101713) (Santa Cruz Biotechnology-EUA). As proteínas foram normalizadas pelo GAPDH (6C5sc-32233, Santa Cruz Biotechnology). A proteína muscular foi extraída com tampão RIPA, o produto sobrenadante pelo teste Bradford. As amostras foram separadas em gel de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpos primários, lavada com TBS e Tween, incubada com anticorpos conjugados com peroxidase secundários. Substrato quimioluminescente Super Signal® West Pico (Pierce Protein Research Products, Rockford-EUA) foi usado para reter os anticorpos citados (Gomes et al., 2016).

## **Análise estatística**

Os dados foram expressos média  $\pm$  desvio. A comparação entre os grupos Sham e EAo foi realizada pelo teste "t" Student ou Mann Whitney. As comparações dos sinais clínicos foi realizada com Teste exato de Fisher. As comparações finais do experimento realizadas por análise de variância Anova de duas vias, complementada pelo teste de Tukey (Rosa et al., 2016). O nível de significância considerado foi de 5%. Foi utilizado o software estatístico Systat 13.0.

## **RESULTADOS**

### **Caracterização dos grupos experimentais e parâmetros anatômicos**

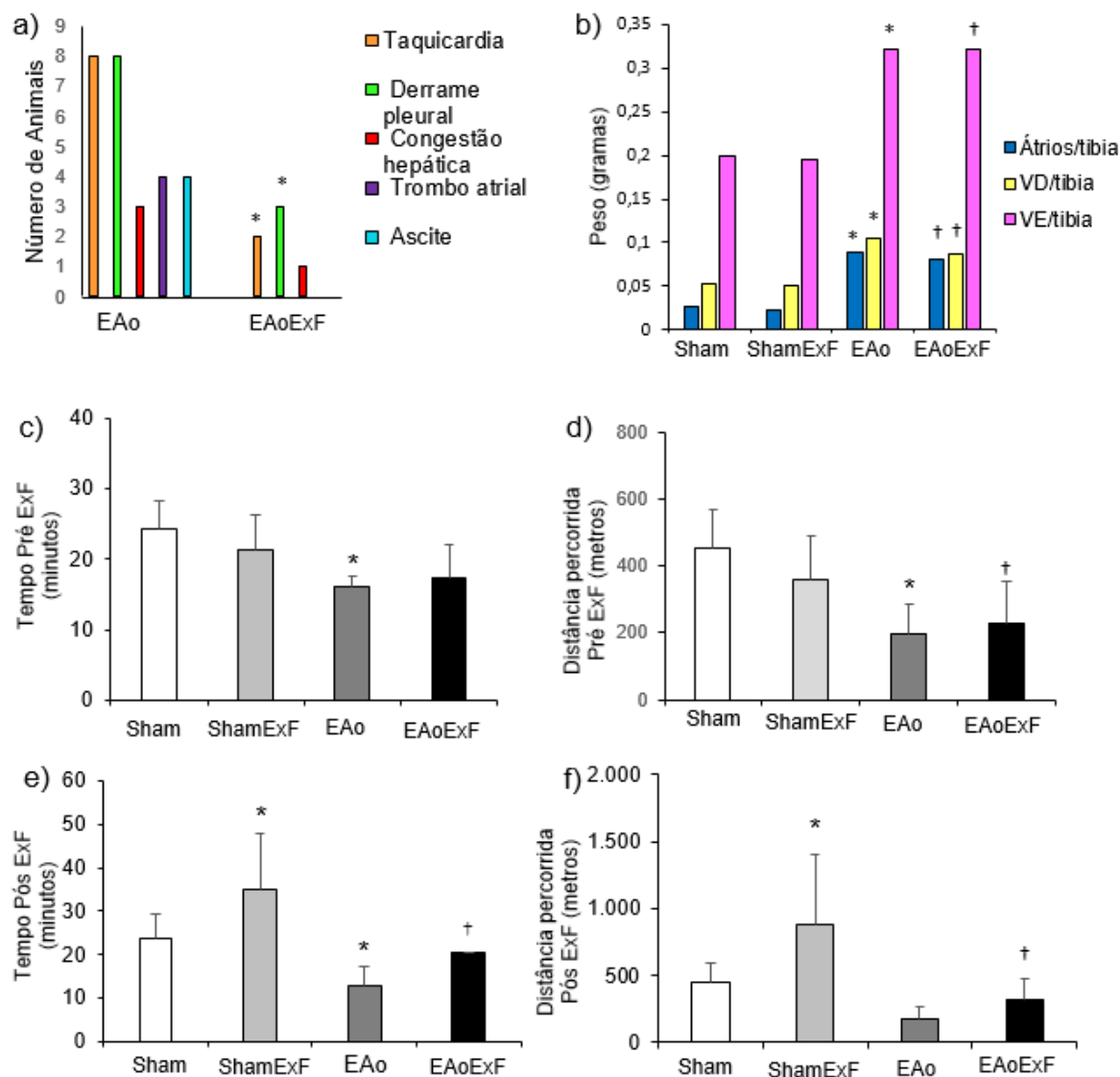
Ao final do experimento considerou-se a taxa de mortalidade nos animais que realizaram a cirurgia de estenose aórtica foi de 48%, semelhante a outra pesquisa (Bregagnollo et al., 2007). No exame post-mortem, nenhum rato Sham e ShamExF apresentaram sinais de IC. O grupo EAo apresentou sinais de IC e no grupo EaoExF houve diminuição desses (Fig.2a).

O peso corporal final foi menor nos ratos EAo e EAoExF, comparado com Sham e ShamExF. O peso do VE/tibia, VD/tibia e átrios/tibia foram maiores nos grupos EAo e EAoExF, comparados com os Sham e ShamExF (Fig.2b).

### **Capacidade Funcional ao Exercício**

No teste de esforço realizado antes de iniciar o protocolo de ExF, os ratos dos grupos com EAo e EAoExF apresentaram menor distância percorrida e tempo, comparados com os controles (Fig.2c/2d). No teste realizado ao final do

experimento, os ratos dos grupos ShamExF e EAoExF tiveram um melhor desempenho físico (Fig.2e/2f).



**Figura 2.** Sinais clínicos de IC (a); Parâmetros anatômicos (normalizados pela tibia) (b); Tempo definido pelo Teste de Esforço realizado pré (c) e pós ExF (d); Distância percorrida pré (e) e pós ExF (f). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão ou mediana e percentis. Grupos: Sham (controle, n=8); ShamExF (controle exercício físico, n=8); EAo (Estenose aórtica controle, n=8) EAoExF (estenose aórtica exercício físico, n=8). \*  $p < 0,05$  vs. Sham; †  $p < 0,05$  vs. ShamExF. Teste exato de Fisher e ANOVA de duas vias com *post hoc* de Tukey.

## Avaliação Estrutural e Funcional Cardíaca pelo Ecocardiograma

Os dados do ecocardiograma realizado com 18 semanas estão descritos na Tabela 1. O grupo EAo apresentou hipertrofia ventricular concêntrica (aumento espessura parede VE), massa do VE, diâmetro do átrio esquerdo quando comparado com respectivo controle. Funcionalmente, o grupo EAo apresentou disfunção sistólica (redução VEPP VE E PEE), e disfunção diastólica maior (E/A).

**Tabela 1.** Dados estruturais e funcionais ecocardiográficos (18 semanas).

VARIAVEIS	Sham (n=16)	EAo (n=16)
DDVE/PCF(mm/Kg)	15.4±2.01	18.1±2.57*
EDPP(mm)	1.66[1.48-1.79]	2.81[2.55-3.07]*
AE/PCF(mm/Kg)	9.72[8.89-12.73]	18.92[12.23-22.73]*
Massa VE(g)	0.91±0.21	2.24±0.40*
Esp.rel.VE	0.45±0.03	0.76±0.10
PEE%	57.93±3.35	53.14±7.19*
VEPP(mm/s)	58.71±5.73	40.13±8.79*
Índice Tei	0.42±0.18	0.45±0.13*
TDI-S'(media mm/s)	5.70±0.59	4.00±0.64*
E/A	1.42±0.11	4.46±2.33*

Dados em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. DDVE/PCF; Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE)/peso corporal final; EDPP espessura parede posterior; AE/PCF: diâmetro átrio esquerdo/peso corporal final; massa VE; Esp. Rel. VE: espessura relativa parede VE; PEE: porcentagem encurtamento endocardial; VEPP: velocidade encurtamento parede posterior; Índice Tei: índice performance miocárdica VE; TDI-S': velocidade sistólica anular mitral por imagem Doppler tecidual (média entre velocidade parede lateral e septal); E/A: razão entre picos velocidade fluxo

enchimento inicial (onda E) e contração atrial (onda A) fluxo transmitral (A). Grupos: Sham (controle); EAo (Estenose aórtica controle). \*  $p < 0,05$  vs. Sham. Teste "t" Student ou Mann Whitney.

O ecocardiograma realizado com 28 semanas, demonstra os grupos EAo e EAoExF apresentaram aumento do diâmetro diastólico e da espessura relativa do VE, hipertrofia ventricular concêntrica (aumento massa VE), minimizado no grupo exercitado, o tamanho do átrio (AE/PCF) foi menor 11% nos animais EAoExF comparado com o EAo. Funcionalmente, os animais do grupo EAoExF apresentaram uma melhora na disfunção sistólica comparados com seu controle, observado pela melhora da PEE% menor em 10% e do VEPP menor 22%. A disfunção diastólica final foi grave (aumento relação E/A) e o ExF não foi capaz de atenuar esta condição. Foram observadas alterações significativas no Índice Tei (maior 53%) e TDI's (menor 20%) evidenciando a melhora dos parâmetros de função cardíaca dos animais EAoExF comparados com EAo (Tabela 2).

**Tabela 2.** Dados estruturais e funcionais ecocardiográficos (28 semanas).

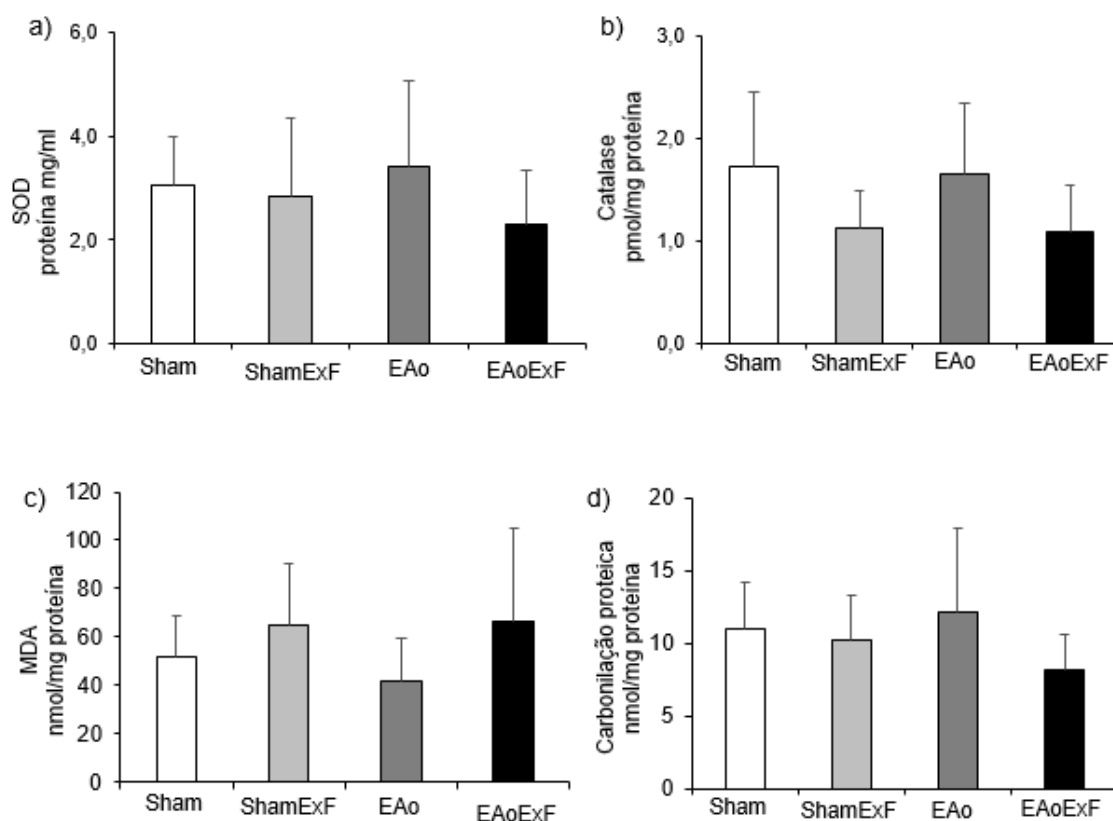
VARIAVEIS	Sham (n=8)	ShamExF (n=8)	EAo (n=8)	EAoExF (n=8)
DDVE/PCF (mm/kg)	15.33±1.39	14.91±1.59	17.54±1.45*	15.84±2.80
EDPP	1.66±0.13	1.66±0.13	2.96±0.20*	2.88±0.21†
AE/PCF (mm/kg)	9.18±0.99	9.62±1.50	19.50±1.02*	17.18±2.55 <sup>#</sup> †
Massa VE	1.06±0.24	0.94±0.10	2.24±0.19*	2.18±0.37†
Esp.Rel.VE	0.40±0.03	0.43±0.02	0.75±0.08*	0.71±0.05†
PEE%	55.78±3.10	57.15±5.86	48.18±4.81*	53.46±4.00 <sup>#</sup>
VEPP	58.57±4.75	65.00±8.02	40.14±6.54*	47.14±3.93 <sup>#</sup> †
Índice Tei	0.40±0.16	0.31±0.09	0.45±0.23	0.21±0.06 <sup>#</sup>
TDIs	5.61±0.40	5.94±0.36	3.67±0.31*	4.41±0.23 <sup>#</sup> †

<b>E/A (mm)</b>	1.41±0.29	1.52±0.09	5.69±1.03*	4.63±2.45†
-----------------	-----------	-----------	------------	------------

Dados em média ± desvio padrão ou mediana, percentis. DDVE/PCF; Diâmetro diastólico ventrículo esquerdo (VE)/peso corporal final; EDPP espessura parede posterior; AE/PCF: diâmetro átrio esquerdo/peso corporal final; massa VE; Esp. Rel. VE: espessura relativa parede VE; PEE: porcentagem encurtamento endocardial; VEPP: velocidade encurtamento parede posterior; Índice Tei: índice performance miocárdica VE; TDI-S': velocidade sistólica anular mitral por imagem Doppler tecidual (média entre velocidade parede lateral e septal); E/A: razão entre picos velocidade fluxo de enchimento inicial (onda E) e contração atrial (onda A) fluxo transmitral (A). Grupos: Sham (controle); ShamExF (controle exercício físico); EAo (Estenose aórtica controle) EAoExF (estenose aórtica exercício físico). \* p<0,05 vs. Sham; # p<0,05 vs. EAo; † p<0,05 vs. ShamExF. ANOVA de duas vias com *post hoc* de Tukey.

### **Avaliação do Estresse Oxidativo**

A atividade das enzimas antioxidantes SOD (Fig.3a) e Catalase (Fig.3b), a MDA (Fig.3c) e Carbonilação Proteica (Fig.3d) não diferiram entre os grupos.

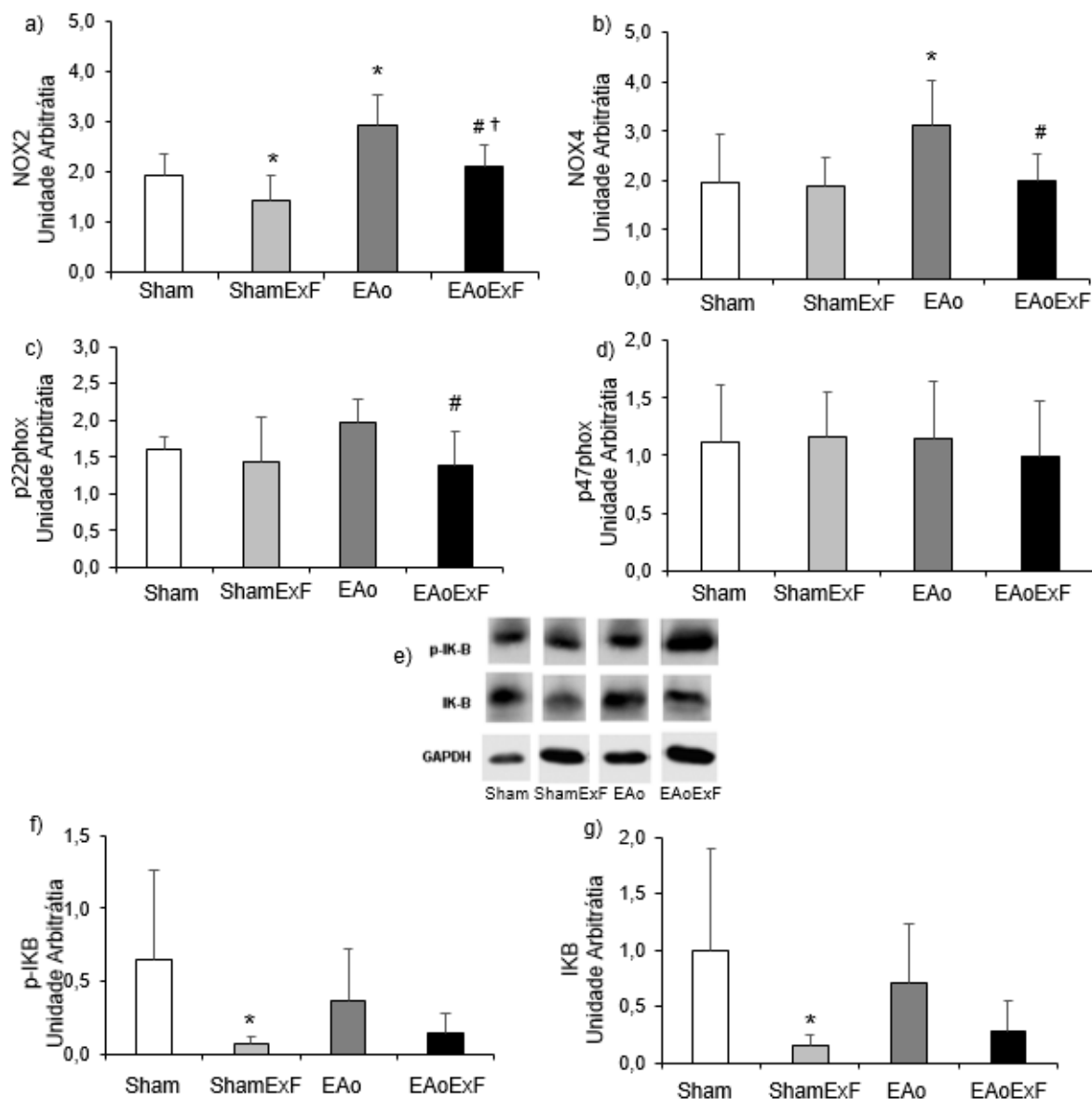


**Figura 3:** Avaliação da Superóxido Dismutase (a), Catalase (b), Peroxidação lipídica (c) e Carbonilação proteica (d). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Grupos: Sham (controle, n=8); ShamExF (controle exercício físico, n=8); EAo (Estenose aórtica controle, n=8) EAoExF (estenose aórtica exercício físico, n=8).  $p < 0.05$ . ANOVA de duas vias com *post hoc* de Tukey.

### Avaliação da expressão gênica: PCR-RT em tempo real

A expressão gênica do Nox2 diferiu entre os grupos Sham vs. EAo, ShamExF vs. EAo, ShamExF vs. EAoExF, EAo vs. EAoExF, sendo menores nos grupos exercitados, comparados com seus controles. O exercício diminuiu as fontes EROS em 27% no grupo EAoExF, comparado com o EAo (Fig.4a). O Nox4 diferiu entre os grupos Sham vs. EAo, ShamExF vs. EAo, sendo 36% menor no grupo EAoExF comparado com EAo (Fig.4b). A expressão do p22phox foi menor 30% no grupo

EaoExF que no grupo Eao (Fig.4c). Não foi encontrada diferenças nos valores de p47phox entre os grupos avaliados. (Fig.4d).



**Figura 4:** Expressão gênica da via NADPH oxidase (subunidades: a) Nox2, b) Nox4, c) p22-phox e d) p47-phox) e expressão proteica da via IK-B: e) membrana, f) fosforilada e g) total. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão ou mediana e percentis. Grupos: Sham (controle, n=8); ShamExF (controle exercício físico, n=8); EAO (Estenose aórtica controle, n=8) EAOExF (estenose aórtica exercício físico, n=8).  $p < 0,05$ . \*  $p < 0,05$  vs. Sham; #  $p < 0,05$  vs. EAO; †  $p < 0,05$  vs. ShamExF. ANOVA de duas vias com *post hoc* de Tukey.

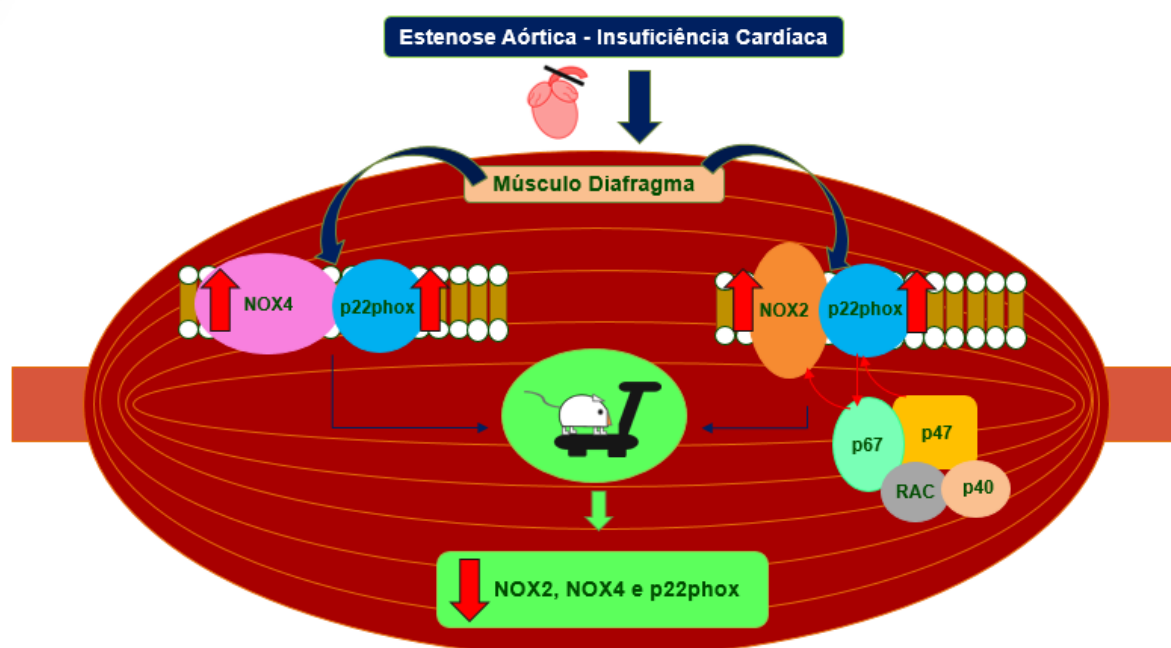


## Avaliação da expressão proteica: Western Blot

Os resultados da expressão proteica do IK-B está expressa na Fig.4e, onde a forma fosforilada p-IK-B (Fig.4f) foi menor em 89,6% no grupo ShamExF comparado com Sham. A expressão proteica do IK-B total não diferiu entre os grupos (Fig.4g).

## DISCUSSÃO

O principal achado desse estudo foi que o ExF atenuou as fontes de EROs, através da diminuição da expressão gênica das subunidades NOX2, NOX4 e p22phox no músculo diafragma de ratos com IC induzida por estenose aórtica (Fig. 5). Além disso, o ExF melhorou os parâmetros de função cardíaca (observados pelo Índice Tei e TDI's) e amenizou a disfunção sistólica observados pelos índices PEE% e VEPP. Entender os mecanismos envolvidos no estresse oxidativo do diafragma de ratos com EAo submetidos a ExF são fundamentais para elaboração de abordagens terapêuticas eficazes.



**Figura 5:** Esquema que demonstra os achados do estudo.

O diafragma é o principal músculo inspiratório e sua miopatia na IC ocorre devido as suas propriedades contráteis, metabólicas e suas respostas a agentes estressores (Powers, Wiggs, Sollanek, & Smuder, 2013). Estudos anteriores tem demonstrado que esse músculo é mais sensível e apresenta alterações em maiores magnitudes na IC principalmente no que se confere ao seu metabolismo oxidativo (Kelley & Ferreira, 2017; Mangner et al., 2013). A disfunção diafragmática na IC está relacionada a predisposição a pneumonia, incapacidade de manter a ventilação durante exercício físico, respiração superficial que prejudica a ventilação alveolar, o que afeta diretamente a qualidade de vida, contribuindo para aumento de morbidade e mortalidade por IC (Kelley & Ferreira, 2017).

Um dos modelos utilizados para indução e avaliação da IC é a estenose aórtica, que acarreta uma obstrução gradativa no VE provocando disfunção ventricular e posteriormente IC (entre 18-28 semanas pós cirurgia), semelhante a IC no humano (Gomes et al., 2016). Em nosso estudo, os animais dos grupos EAo e EAoExF foram submetidos a cirurgia de estenose aórtica, e foi realizado o ecocardiograma para caracterização da disfunção cardíaca antes do protocolo de exercício (18 semanas). Nesse momento os ratos EAo apresentaram aumento da espessura e massa do VE e dos átrios, (hipertrofia do VE e dos átrios), com discreta disfunção sistólica e disfunção diastólica. Após o protocolo de exercício (28 semanas), verificou-se as mesmas alterações ecocardiográficas nos animais do grupo EAo, porém com maior gravidade. Contudo, houve uma atenuação da disfunção sistólica dos ratos EAoExF comparados com os EAo observado pelos valores da VEPP e PEE. A disfunção diastólica também foi minimizada com o ExF nos animais com IC, onde a foi observado a melhora na onda E/A. Foi observado

uma melhora na função cardíaca através dos parâmetros TDI's e Índice Tei. Pesquisas realizadas nesse modelo também demonstraram aumento da capacidade funcional sem relação com os dados ecocardiográficos. Isso demonstra uma possível influência de modificações musculares respiratórias e periféricas com o ExF (Gomes et al., 2016; Reyes et al., 2019). Nosso estudo observou que o ExF é uma conduta eficaz na melhora da função cardíaca.

A via NADPH oxidase está relacionada com fontes de EROs e com o estresse oxidativo. Os músculos esqueléticos podem gerar grande quantidade de EROs que podem ser produzidos por diferentes estímulos, como a ativação da via NADPH oxidase (Gomes et al., 2017). Nós avaliamos a atividade deste complexo através das subunidades (NOX2, NOX4, p22 phox, p47 phox) para estabelecer relação desta fonte geradora de EROS no diafragma em ratos com IC e verificar se o ExF interfere nesta condição. Observamos um aumento nas subunidades do complexo NADPH oxidase (NOX2, NOX4 e p22phox) no músculo diafragma onde a EAo ativou as fontes de EROs, porém, sem alterar o equilíbrio redox. O ExF atenuou essa ativação da EROs, demonstrando ser uma conduta benéfica para esse importante músculo. A disfunção diafragmática em modelos animais na IC relaciona-se com as EROs, onde encontra-se uma importante fonte nesse músculo que é NOX2, constituída por várias subunidades (NOX2, p22 phox, p47 phox, p67 phox, Rac 1/2). Foi demonstrado que a ativação do NOX2 depende da fosforilação do p47 phox e sua diminuição previne a disfunção contrátil e o aumento EROs (Ahn et al., 2016; Ferreira & Laitano, 2016). Nosso estudo mostrou que p47 phox manteve os mesmos padrões que as outras subunidades avaliadas, onde aumentou no grupo EAo e o exercício foi capaz de diminuir os níveis desta subunidade, e desta forma, atenuou a geração das EROS. Observamos um aumento dos níveis de NOX4, e o

exercício físico atuou de forma benéfica, neutralizando esta fonte geradora de EROs, que é constitutivamente ativa, não dependendo de subunidades citosólicas para sua ativação (Martyn, Frederick, von Loehneysen, Dinauer, & Knaus, 2006).

Os tipos de exercícios em músculos esqueléticos podem interferir de formas distintas nas fontes de EROS. Pesquisa realizada em camundongos hipertensos que realizaram 2 semanas de exercício intervalado de alta intensidade (HIIT) constatou que o mesmo foi capaz de proteger o diafragma frente as EROs (via NADPH) e atenuou o estresse oxidativo (Bowen et al., 2017). Outro estudo que realizou protocolo exercício aeróbio durante 8 semanas em ratos com IC devido estenose aórtica observou na musculatura periférica (músculo sóleo) que a via NADPH não melhorou com o exercício (Gomes et al., 2016). Em estudo que avaliou ratos com IC devido EAo, submetidos a protocolo de exercício físico apresentou divergências no músculo quadríceps e diafragma, pois houve um aumento do complexo NADPH oxidase no quadríceps, que não foi observado no diafragma (Mangner et al., 2015). Acreditamos que as divergências de resultados podem estar relacionado com a gravidade da IC causada pelas doenças de base, com as características do diafragma, comparado com músculos periféricos e com o tipo e a intensidade do exercício, pois estudo realizado em animais com protocolo de ExF de alta intensidade (HIIT) obtiveram resultados favoráveis somente com 2 semanas de treino.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento dos níveis de EROS e os músculos esqueléticos por consumir uma grande quantidade de oxigênio, favorecem o aumento nas fontes de EROS, que fisiologicamente são neutralizadas pelo mecanismo antioxidante (Gomes et al., 2017). Nós avaliamos o estresse oxidativo por meio da carbonilação proteica e MDA e das enzimas antioxidantes pelos níveis

da SOD e catalase. Tanto o estresse oxidativo quanto o mecanismo antioxidantes não diferiram entre os grupos. Estudo experimental realizado em ratos com IC devido estenose aórtica, observou no músculo sóleo um aumento da peroxidação lipídica, caracterizando estresse oxidativo e o exercício combateu esta alteração, houve um aumento da SOD como mecanismo antioxidante frente ao estresse (Gomes et al., 2016).

O estresse oxidativo pode influenciar o complexo IK-B quinase (IKK) que induz a fosforilação de IK-B (Li, Malhotra, & Kumar, 2008; Zandi, Rothwarf, Delhase, Hayakawa, & Karin, 1997). Este fato já foi demonstrado no músculo sóleo em ratos com IC, devido aumento dos níveis do IK-B fosforilado e do NF-kB (Martinez et al., 2016). A fosforilação do IK-B ocorre através da via ubiquitinação, onde o IK-B se desliga do NF-kB, o NF-kB migra para o núcleo, onde se liga com genes alvo (Ghosh & Karin, 2002). A via relacionada com NF-kB exerce relação com mediadores de inflamação, imunidade, diminuição da massa muscular e caquexia (expressos no músculo esquelético) (Bonaldo & Sandri, 2013). Nesse estudo embora houve ativação das fontes geradoras de EROS não alterou o estresse oxidativo a essa via. Em estudo que realizou exercício físico em ratos com IC, houve melhora no estresse oxidativo no músculo sóleo, porém, sem melhorar a via do complexo IK-B e NF-KB (Gomes et al., 2016). Acreditamos que em nosso estudo o estresse oxidativo e a vias do IK-B sejam ativadas de forma mais tardia devido as características metabólicas e funcionais do diafragma, e devido à gravidade da IC, que torna este músculo mais resistente as modificações comparado a musculatura periférica, pois encontramos somente um aumento das fontes de EROs e não do balanço redox. Pesquisa realizada no músculo diafragma observou predominância de fibras de contração rápida e metabolismo oxidativo (Mantilla & Sieck, 2013). Já o

músculo sóleo apresenta contração lenta e metabolismo oxidativo. O músculo esquelético é composto por tecidos que podem alterar suas características metabólicas, morfológicas e funcionais (Gomes et al., 2017). De forma semelhante ocorre na distrofia muscular de Duchenne, onde o músculo diafragma é o último a ser acometido, comparado com os músculos periféricos (Shimizu-Motohashi et al., 2019). Desta forma, entendemos que o diafragma é ativado posteriormente aos músculos periféricos frente ao estresse oxidativo.

Estudos pré clínicos são importantes com esta temática pois constata que prática de exercício físico aeróbio em animais protege o músculo diafragma sobre as fontes de estresse oxidativo e demonstra a importância desta modalidade como tratamento efetivo frente esta condição.

Diante do exposto conclui-se que o protocolo de ExF nos ratos com IC induzida por estenose aórtica é uma conduta eficaz pois foi capaz de minimizar as disfunções cardíacas e diminuir a geração das fontes de EROs do músculo diafragma.

## **INFORMAÇÃO ADICIONAL**

Os autores declaram que não há conflito de interesses que possa interferir na imparcialidade deste trabalho científico.

## **REFERÊNCIAS**

Ahn, B., Beharry, A. W., Frye, G. S., Judge, A. R., & Ferreira, L. F. (2015). NAD(P)H oxidase subunit p47phox is elevated, and p47phox knockout prevents

diaphragm contractile dysfunction in heart failure. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 309(5), L497-505.  
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00176.2015>

Ahn, B., Coblenz, P. D., Beharry, A. W., Patel, N., Judge, A. R., Moylan, J. S., ...  
Ferreira, L. F. (2016). Diaphragm Abnormalities in Patients with End-Stage Heart  
Failure: NADPH Oxidase Upregulation and Protein Oxidation. *Frontiers in  
Physiology*, 7, 686. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00686>

Bonaldo, P., & Sandri, M. (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle  
atrophy. *Disease Models & Mechanisms*, 6(1), 25–39.  
<https://doi.org/10.1242/dmm.010389>

Bowen, T. S., Eisenkolb, S., Drobner, J., Fischer, T., Werner, S., Linke, A., ...  
Adams, V. (2017). High-intensity interval training prevents oxidant-mediated  
diaphragm muscle weakness in hypertensive mice. *The FASEB Journal*, 31(1),  
60–71. <https://doi.org/10.1096/fj.201600672R>

Bregagnollo, E. A., Mestrinel, M. A., Okoshi, K., Carvalho, F. C., Bregagnollo, I. F.,  
Padovani, C. R., & Cicogna, A. C. (2007). Papel relativo da remodelação  
geométrica do ventrículo esquerdo, morfológica e funcional do miocárdio na  
transição da hipertrofia compensada para a falência cardíaca em ratos com  
estenose aórtica supravalvar. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 88(2), 225–  
233. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2007000200015>

Carvalho, R. F., Castan, E. P., Coelho, C. A., Lopes, F. S., Almeida, F. L. A.,  
Michelin, A., ... Dal Pai-Silva, M. (2010). Heart failure increases atrogen-1 and  
MuRF1 gene expression in skeletal muscle with fiber type-specific atrophy.  
*Journal of Molecular Histology*, 41, 81–87. <https://doi.org/10.1007/s10735-010->

9262-x

de Souza, P. A. T., de Souza, R. W. A., Soares, L. C., Piedade, W. P., Campos, D. H. S., Carvalho, R. F., ... Dal-Pai-Silva, M. (2015). Aerobic training attenuates nicotinic acetylcholine receptor changes in the diaphragm muscle during heart failure. *Histology and Histopathology*, 30(7), 801–811.

<https://doi.org/10.14670/HH-11-581>

dos Santos, K. C., Cury, S. S., Ferraz, A. P. C. R., Corrente, J. E., Gonçalves, B. M., de Araújo Machado, L. H., ... Corrêa, C. R. (2018). Recovery of Cardiac Remodeling and Dysmetabolism by Pancreatic Islet Injury Improvement in Diabetic Rats after Yacon Leaf Extract Treatment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/1821359>

Ferreira, L. F., & Laitano, O. (2016). Regulation of NADPH oxidases in skeletal muscle. *Free Radical Biology & Medicine*, 98, 18–28.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.011>

Ghosh, S., & Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, 109 Suppl, S81-96.

Gomes, M. J., Martinez, P. F., Campos, D. H. S., Pagan, L. U., Bonomo, C., Lima, A. R. R., ... Okoshi, M. P. (2016). Beneficial Effects of Physical Exercise on Functional Capacity and Skeletal Muscle Oxidative Stress in Rats with Aortic Stenosis-Induced Heart Failure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 8695716. <https://doi.org/10.1155/2016/8695716>

Gomes, M. J., Martinez, P. F., Pagan, L. U., Damatto, R. L., Cezar, M. D. M., Lima, A. R. R., ... Okoshi, M. P. (2017). Skeletal muscle aging: influence of oxidative stress and physical exercise. *Oncotarget*, 8(12), 20428–20440.



<https://doi.org/10.18632/oncotarget.14670>

*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. (2011).

<https://doi.org/10.17226/12910>

Kelley, R. C., & Ferreira, L. F. (2017). Diaphragm abnormalities in heart failure and aging: mechanisms and integration of cardiovascular and respiratory pathophysiology. *Heart Failure Reviews*, 22(2), 191–207.

<https://doi.org/10.1007/s10741-016-9549-4>

Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010).

Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biology*, 8(6), e1000412.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>

Li, H., Malhotra, S., & Kumar, A. (2008). Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 86(10), 1113–1126. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0373-8>

Lima-Leopoldo, A. P., Leopoldo, A. S., Silva, D. C. T., Nascimento, A. F. do, Campos, D. H. S. de, Luvizotto, R. de A. M., ... Cicogna, A. C. (2013). Influence of long-term obesity on myocardial gene expression. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 100(3), 229–237.

Mangner, N., Linke, A., Oberbach, A., Kullnick, Y., Gielen, S., Sandri, M., ... Adams, V. (2013). Exercise Training Prevents TNF- $\alpha$  Induced Loss of Force in the Diaphragm of Mice. *PLoS ONE*, 8(1), e52274.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052274>

Mangner, N., Weikert, B., Bowen, T. S., Sandri, M., Höllriegel, R., Erbs, S., ...

- Adams, V. (2015). Skeletal muscle alterations in chronic heart failure: differential effects on quadriceps and diaphragm. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 6(4), 381–390. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12034>
- Mantilla, C. B., & Sieck, G. C. (2013). Impact of diaphragm muscle fiber atrophy on neuromotor control. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 189(2), 411–418. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2013.06.025>
- Martinez, P. F., Bonomo, C., Guizoni, D. M., Junior, S. A. O., Damatto, R. L., Cezar, M. D. M., ... Okoshi, M. P. (2015). Influence of N- acetylcysteine on oxidative stress in slow-twitch soleus muscle of heart failure rats. *Cellular Physiology and Biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 35(1), 148–159. <https://doi.org/10.1159/000369683>
- Martinez, P. F., Bonomo, C., Guizoni, D. M., Junior, S. A. O., Damatto, R. L., Cezar, M. D. M., ... Okoshi, M. P. (2016). Modulation of MAPK and NF- $\kappa$ B Signaling Pathways by Antioxidant Therapy in Skeletal Muscle of Heart Failure Rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(1), 371–384. <https://doi.org/10.1159/000445631>
- Martinez, P. F., Okoshi, K., Zornoff, L. A. M., Carvalho, R. F., Oliveira Junior, S. A., Lima, A. R. R., ... Okoshi, M. P. (2010). Chronic heart failure-induced skeletal muscle atrophy, necrosis, and changes in myogenic regulatory factors. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 16(12), BR374-83.
- Martyn, K. D., Frederick, L. M., von Loehneysen, K., Dinauer, M. C., & Knaus, U. G. (2006). Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to

other NADPH oxidases. *Cellular Signalling*, 18(1), 69–82.

<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.03.023>

Pacagnelli, F. L., Aguiar, A. F., Campos, D. H. S., Castan, E. P., de Souza, R. W. A., de Almeida, F. L. A., ... Silva, M. D. P. (2016). Training improves the oxidative phenotype of muscle during the transition from cardiac hypertrophy to heart failure without altering MyoD and myogenin. *Experimental Physiology*, 101(8), 1075–1085. <https://doi.org/10.1113/EP085552>

Pagan, L. U., Damatto, R. L., Cezar, M. D. M., Lima, A. R. R., Bonomo, C., Campos, D. H. S., ... Okoshi, K. (2015). Long-Term Low Intensity Physical Exercise Attenuates Heart Failure Development in Aging Spontaneously Hypertensive Rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36(1), 61–74. <https://doi.org/10.1159/000374053>

Powers, S. K., Wiggs, M. P., Sollanek, K. J., & Smuder, A. J. (2013). Ventilator-induced diaphragm dysfunction: cause and effect. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 305(5), R464–R477. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00231.2013>

Reyes, D. R. A., Gomes, M. J., Rosa, C. M., Pagan, L. U., Zanati, S. G., Damatto, R. L., ... Okoshi, M. P. (2019). Exercise during transition from compensated left ventricular hypertrophy to heart failure in aortic stenosis rats. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(2), 1235–1245. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14025>

Rosa, C. M., Gimenes, R., Campos, D. H. S., Guirado, G. N., Gimenes, C., Fernandes, A. A. H., ... Okoshi, K. (2016). Apocynin influence on oxidative stress and cardiac remodeling of spontaneously hypertensive rats with diabetes mellitus. *Cardiovascular Diabetology*, 15(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s12933->

016-0442-1

Samarghandian, S., Farkhondeh, T., Samini, F., & Borji, A. (2016). Protective Effects of Carvacrol against Oxidative Stress Induced by Chronic Stress in Rat's Brain, Liver, and Kidney. *Biochemistry Research International*, 2016, 1–7.

<https://doi.org/10.1155/2016/2645237>

Savarese, G., & Lund, L. H. (2017). Global Public Health Burden of Heart Failure. *Cardiac Failure Review*, 3(1), 7–11. <https://doi.org/10.15420/cfr.2016:25:2>

Shimizu-Motohashi, Y., Komaki, H., Motohashi, N., Takeda, S., Yokota, T., & Aoki, Y. (2019). Restoring Dystrophin Expression in Duchenne Muscular Dystrophy: Current Status of Therapeutic Approaches. *Journal of Personalized Medicine*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/jpm9010001>

Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M., & Karin, M. (1997). The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *Cell*, 91(2), 243–252.

## **2 ARTIGO REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE**

### **EFEITO DO EXERCÍCIO AERÓBIO NO MÚSCULO DIAFRAGMA NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA: REVISÃO SISTEMÁTICA ESTUDOS PRÉ CLÍNICOS COM METANÁLISE**

#### **REVISÃO EXERCÍCIO NA FORÇA DIAFRAGMÁTICA EM IC**

#### **EFFECT OF AEROBIC EXERCISE ON MUSCLE DIAPHRAGM IN HEART FAILURE: SYSTEMATIC REVIEW PRE-CLINICAL STUDIES WITH METANALYSIS**

#### **REVIEW EXERCISE THE DIAPHRAGMATIC FORCE IN HF**

Ana Karênina Dias de Almeida Sabela<sup>1</sup>, Gabriela Andrade Piemonte Lopes<sup>1</sup>, Ana Paula Coelho Figueira Freire<sup>1</sup>, Rogério Giuffrida<sup>2</sup>, Gisele Alborghetti Nai<sup>2</sup>, Valter Silva<sup>3</sup>, Gabriel Natan de Souza Pires<sup>4</sup>, Francis Lopes Pacagnelli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento Fisioterapia, UNOESTE – Presidente Prudente – Brasil

<sup>2</sup> Programa Pós Graduação: Ciência Animal, UNOESTE – Presidente Prudente – Brasil

<sup>3</sup>Programa Pós Graduação. UNIT – Alagoas – Brasil

<sup>4</sup>Universidade Federal de São Paulo – Departamento de Psicobiologia – São Paulo – Brasil

**Correspondência:** Francis Lopes Pacagnelli, Universidade do Oeste Paulista-Unoeste, Rodovia Raposo Tavares, km572, Bairro Limoeiro, Presidente Prudente-SP-Brasil. CEP:19.067-175. Telefone:(018)3229-2000.

## RESUMO

**OBJETIVO:** Foi realizado uma revisão sistemática com metanálise com o objetivo de responder a seguinte questão: Se o exercício aeróbio induz ganho de força no músculo diafragma em animais com Insuficiência Cardíaca (IC)? **MÉTODOS:** Foi realizado uma revisão sistemática com metanálise utilizando as bases de dados: MEDLINE (via PubMed), EMBASE (via Elsevier) and Web of Science (via ISI Web of Knowledge, Core Collection: SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI, CPCI-S, CPCI-SSH, ESCI) com as seguintes palavras chaves indexadas no DECS: diafragma, exercício, insuficiência cardíaca e força muscular. Após a seleção dos estudos, foi aplicado Syrcle para avaliar risco de viés. A análise estatística foi realizada através da avaliação da heterogeneidade por inspeção visual do Forest Plot, considerando o Teste de  $\chi^2$  (com nível de significância de  $p < 0,10$ ), com heterogeneidade considerada substancial se  $I^2$  for maior que 50%. **RESULTADOS:** Foram incluídos três estudos pré-clínicos que randomizaram 24 ratos e 40 camundongos com IC para comparar o efeito do exercício aeróbio vs. controle IC para o desfecho de força do músculo diafragma. Embora a direção efeito tenha sido favorável ao controle, não foi observada diferença estatística entre as intervenções (SMD 1.16, IC 95% -0.80 a 3.12;  $P = 0.25$ ; 3 estudos; 64 animais). A magnitude da heterogeneidade estimada pela estatística  $I^2$  foi alta e estatisticamente significativa ( $I^2 = 91\%$ ;  $p < 0.0001$ ). **CONCLUSÕES:** Devido às limitações dos estudos incluídos, mais estudo pré-clínicos são necessário para estabelecer o efeito do exercício na força do músculo diafragma em animais com IC.

**Palavras chaves:** Insuficiência Cardíaca; Diafragma; Exercício; Força Muscular.

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** A systematic review with meta-analysis was carried out to answer the following question: Should aerobic exercise induce strength gain in the diaphragm muscle in animals with heart failure (HF)? **METHODS:** A systematic review meta-analysis was performed using the databases MEDLINE (via PubMed), EMBASE (via Elsevier) and Web of Science (via ISI Web of Knowledge, Core Collection: SCI-EXPANDED, SSCI, A & HCI, CPCI-S, CPCI-SSH, ESCI) with the following key words indexed in DECS: diaphragm, exercise, heart failure and muscle strength. After the selection of the studies, Syrcle was applied to assess risk of bias. Statistical analysis was performed by assessing the heterogeneity by visual inspection of Forest Plot, considering Chi<sup>2</sup> Test (with significance level of  $p < 0.10$ ), with heterogeneity considered substantial if  $I^2$  is greater than 50%. **RESULTS:** We included three preclinical studies that randomized 24 rats and 40 mice with HF to compare the effect of aerobic vs. control IC for the strength end of the diaphragm muscle. Although the effect direction was favorable to control, no statistical difference was observed between the interventions (MDS 1.16, 95% CI -0.80 to 3.12,  $P = 0.25$ , 3 studies, 64 animals). The magnitude of the heterogeneity estimated by the  $I^2$  statistic was high and statistically significant ( $I^2 = 91%$ ,  $p < 0.0001$ ). **CONCLUSIONS:** Due to the limitations of the included studies, more preclinical studies are needed to establish the effect of exercise on the strength of the diaphragm muscle in animals with HF.

**Key words:** Heart Failure; Diaphragm; Exercise; Muscle strength.

## INTRODUÇÃO

A Insuficiência Cardíaca (IC) é uma síndrome complexa que ocorre na fase final de muitas patologias cardíacas e é causa de grande morbidade e mortalidade em todo o mundo <sup>1,2</sup>. No decorrer do envelhecimento, evidências apontam que a disfunção inspiratória ocorre de maneira saudável, porém, quando associado a gravidade da IC pode acontecer de forma mais acentuada. <sup>3,4</sup>. As principais anormalidades músculo esqueléticas e respiratórias são atrofia, fibrose, diminuição da capacidade oxidativa, alterações de miosinas e disfunção contrátil <sup>5</sup>. Estas alterações contribuem para o cansaço e dispneia, ocasionando intolerância ao exercício físico <sup>6</sup>.

A fraqueza do músculo diafragma, principal responsável pela respiração, está bem estabelecida na IC, tanto em pacientes (in vivo) como em modelo animal (in vitro) e que acarreta a dispneia, diminuição da capacidade funcional e morte <sup>7-9</sup>. Contribui também para essas alterações o aumento do espaço morto fisiológico, menor capacidade de difusão pulmonar e distúrbios pulmonares obstrutivos/restritivos <sup>10</sup>.

Há um aumento no número de estudos que constata uma série de benefícios do exercício físico na IC <sup>2,11</sup>, sendo que a intervenção com exercício físico aeróbio pode proteger contra a disfunção da fibra contrátil do diafragma induzida pela IC, conduta essa utilizada também para disfunções músculo esqueléticas também na IC <sup>9</sup>. O exercício físico aeróbio é uma conduta adotada tanto para aumentar a longevidade como para proporcionar bem estar e uma vida saudável <sup>2,12</sup>, por atuar nas disfunções do sistema músculo esquelético, tanto em animais quanto humanos. As melhoras musculares estão relacionadas a alterações como melhora do fluxo sanguíneo, aumento da oxigenação microvascular e capilares sanguíneos,



redução dos níveis de citocinas inflamatórias, aumento da capacidade oxidativa mitocondrial, favorecendo desta forma uma melhor capacidade funcional <sup>9</sup>.

O músculo diafragma exerce um papel fundamental na mecânica respiratória <sup>13</sup>. Durante o exercício aeróbio, ocorre um aumento da frequência cardíaca e respiratória e com isso, aumenta a força de contração do músculo diafragma de forma fisiológica. Sabe-se que os exercícios de resistência influencia diretamente no ganho de força muscular, porém os exercícios aeróbios este ganho de força ocorre em menor proporção. Acreditamos que esta modalidade de exercício, por alterar as propriedades contráteis influencie diretamente no ganho de força muscular diafragmática. Assim, realizamos uma revisão sistemática e metanálise. A questão a ser respondida com esta revisão: 1. O exercício aeróbio induz ganho de força no músculo diafragma na insuficiência cardíaca?

## **MÉTODOS**

### **Registro do estudo**

Antes do cadastro desse estudo foi realizada uma análise para verificar se não existia revisões já realizadas ou em andamento nessa temática. Este trabalho foi cadastrado e aprovado no Prospero (Registro prospectivo internacional de revisões sistemáticas) sob o número CRD42019129551.

### **Critérios para considerar estudos para esta revisão (PICO)**

#### **- Critério de Elegibilidade**

Foram incluídos estudos em modelo experimental de ratos com IC os quais foram submetidos a intervenções de exercício físico aeróbio. Os estudos tiveram o seguinte “PICO”:

#### **- População (animais)**

Critérios de inclusão: estudo animal, masculino e feminino, insuficiência cardíaca, exercício, diafragma, força muscular.

Critério de exclusão: Quando não há evidência de insuficiência cardíaca e nenhuma avaliação da força muscular respiratória.

#### **- Intervenção**

Critérios de inclusão: exercício aeróbio, duração, frequência e intensidade.

Critérios de exclusão: exercício intervalado de alta intensidade (HIIT) e exercício respiratório.

#### **- Comparação**

Critérios de inclusão: animais com insuficiência cardíaca que não realizaram nenhum tipo de exercício.

Critérios de exclusão: quando não atende aos critérios de inclusão.

#### **- Desfechos**

Critérios de inclusão: Estudos em modelo experimental de ratos com IC submetido a exercícios físico aeróbio e os efeitos adversos.

Critérios de exclusão: quando não atende aos critérios de inclusão

O desfecho primário avaliado foi: força do músculo diafragma e os efeitos adversos.

### **Método de pesquisa para identificação de estudos**

Para identificarmos todos os estudos originais sobre “Efeito do exercício para o músculo diafragma na Insuficiência Cardíaca”, realizamos uma busca nas seguintes bases de dados: PubMed (via Mesh; 14 trabalhos publicados), Embase (via Elsevier; 36 trabalhos publicados) e Web of Science (59 trabalhos publicados) até março de 2019. Foi utilizado uma estratégia de busca em três fases. A estratégia de busca realizadas nas bases: MEDLINE (via PubMed), EMBASE (via Elsevier) and Web of Science (via ISI Web of Knowledge, Core Collection: SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI, CPCI-S, CPCI-SSH, ESCI) estão descritas na Tabela 1. Não houve restrição quanto ao idioma dos artigos, data ou status da publicação na pesquisa da literatura.

Os estudos selecionados atenderam aos seguintes critérios: 1. Animais, 2. Protocolo de exercício aeróbio, 3. Patologia para desenvolver IC, 4. Avaliação da força contrátil do músculo diafragma (in vitro).

**Tabela 1.** Estratégia de busca realizada nas bases de dados: MEDLINE (via PubMed), EMBASE (via Elsevier) and Web of Science (via ISI Web of Knowledge, Core Collection: SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI, CPCI-S, CPCI-SSH, ESCI).

<b>Componentes</b>	<b>Descritores</b>
Diaphragm	"Diaphragm" OR "Diaphragms" OR "Respiratory Diaphragm" OR "Diaphragm, Respiratory" OR "Diaphragms, Respiratory" OR "Respiratory Diaphragms"

Exercise	"Exercise" OR "Exercises" OR "Physical Activity" OR "Activities, Physical" OR "Activity, Physical" OR "Physical Activities" OR "Exercise, Physical" OR "Exercises, Physical" OR "Physical Exercise" OR "Physical Exercises" OR "Acute Exercise" OR "Acute Exercises" OR "Exercise, Acute" OR "Exercises, Acute" OR "Exercise, Isometric" OR "Exercises, Isometric" OR "Isometric Exercises" OR "Isometric Exercise" OR "Exercise, Aerobic" OR "Aerobic Exercise" OR "Aerobic Exercises" OR "Exercises, Aerobic" OR "Exercise Training" OR "Exercise Trainings" OR "Training, Exercise" OR "Trainings, Exercise"
Heart Failure	"Heart Failure" OR "Cardiac Failure" OR "Heart Decompensation" OR "Decompensation, Heart" OR "Heart Failure, Right-Sided" OR "Heart Failure, Right Sided" OR "Right-Sided Heart Failure" OR "Right Sided Heart Failure" OR "Myocardial Failure" OR "Congestive Heart Failure" OR "Heart Failure, Congestive" OR "Heart Failure, Left-Sided" OR "Heart Failure, Left Sided" OR "Left-Sided Heart Failure" OR "Left Sided Heart Failure"
Muscle strength	"Muscle strength" OR "Muscle Contraction"

### **Seleção dos estudos e extração de dados**

O processo de seleção e extração dos dados foi dividido em três fases. Na primeira fase o investigador (a) que é o primeiro autor, selecionou estudos com base no título e no resumo, posteriormente, dois pesquisadores (b), primeiro e segundo autores, selecionou os trabalhos da mesma forma que anteriormente, onde as diferenças foram resolvidas como um acordo.

A segunda fase foi realizada por dois pesquisadores (primeiro e segundo autores), uma análise mais profunda dos artigos completos, onde as divergências foram resolvidas como um acordo mútuo. Na terceira fase o primeiro e segundo

autores realizaram a extração dos dados referentes aos artigos selecionados: avaliação da força do músculo diafragma em animais submetidos a exercício físico na IC.

Foi avaliado no artigo o tipo de animais (ratos ou camundongos, machos ou fêmeas), frequência e intensidade do exercício. Além destes parâmetros, realizamos a medida do desfecho primário através da mensuração da força diafragmática (N/cm<sup>2</sup> - medida unitária elegível).

Para a extração dos dados de força muscular do diafragma dos gráficos dois avaliadores utilizaram a ferramenta WebPlotDigitizer dos grupos IC/sedentário e IC/exercício <sup>14</sup>.

### **Avaliação do risco de viés**

Para a avaliação da qualidade metodológica dos artigos selecionados foi feita por dois revisores. Para cada ensaio clínico selecionado o risco de viés foi avaliado de acordo com Syrcle que leva em consideração 10 questões: 1. Geração de Sequência; 2. Características basais; 3. Ocultação de alocação; 4. Alojamento aleatório; 5. Cegamento (desempenho); 6. Avaliação aleatória dos resultados; 7. Cegamento (detecção); 8. Dados de resultados incompletos; 9. Relatório seletivo; 10. Outros vieses. Os dados para avaliação do risco de viés foram pontuados como sim, não e incerto <sup>15</sup>.

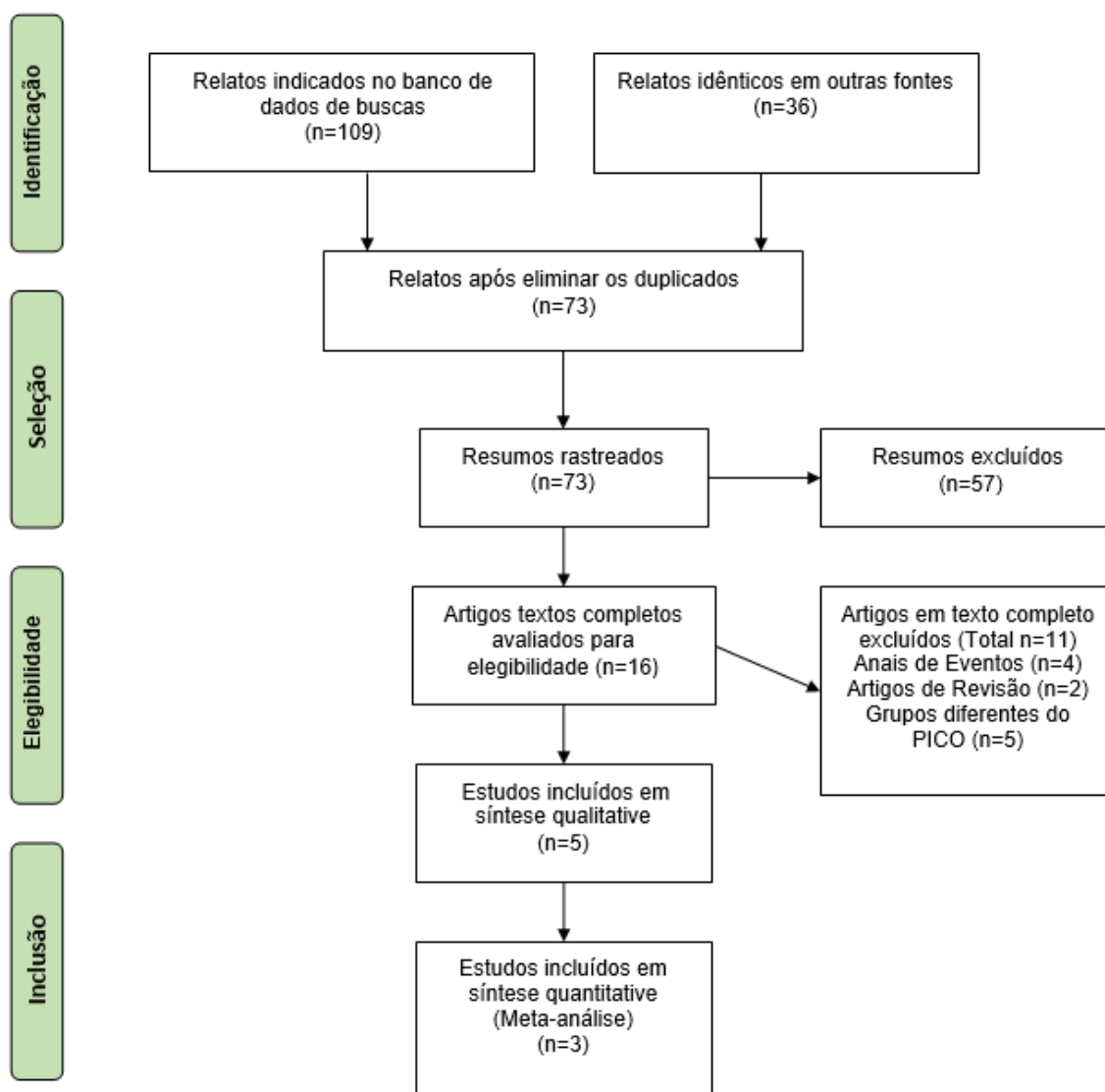
### **Análise estatística**

Para avaliar a heterogeneidade por inspeção visual do Forest Plot, considerando o Teste de  $\text{Chi}^2$  (com nível de significância de  $p < 0,10$ ). Juntos, utilizamos a estatística  $I^2$  quando realizamos a metanálise de efeito fixo, com heterogeneidade considerada substancial se  $I^2$  for maior que 50%.

## **RESULTADOS**

### **Seleção dos estudos e avaliação dos dados**

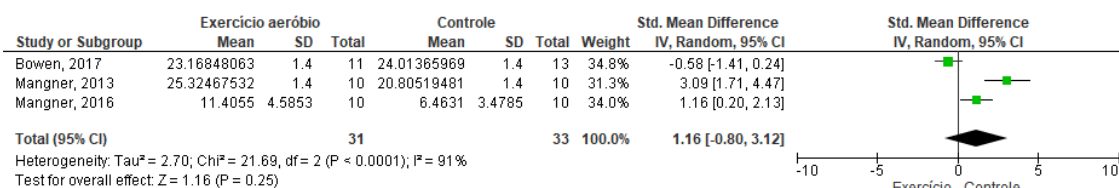
Depois de definidas e aplicadas as estratégias de busca nas bases eletrônicas citadas, foram identificadas 109 referências, que estão descritas na Figura 1<sup>16</sup>. Com base no título e resumo, 57 estudos foram excluídos, restando 16 para avaliação de artigos completos. Destes estudos 11 não preencheram os critérios de inclusão. Por fim, 3 estudos preencheram os critérios de inclusão para esta revisão sistemática com metanálise.



**Figura 1:** Fluxograma para a identificação de estudos elegíveis.

Foram incluídos três estudos pré-clínicos que randomizaram 24 ratos e 40 camundongos com insuficiência cardíaca para comparar o efeito do exercício aeróbio vs. controle para o desfecho de força do músculo diafragma. Em dois estudos<sup>9,17</sup> o desfecho foi medido como unidades de força do diafragma (N/cm<sup>2</sup>) e no outro estudo<sup>7</sup> a força do diafragma foi reportada como percentual da força máxima. A estimativa de efeito foi mensurada por meio da diferença média padronizada em uma metanálise de efeito randômico. Embora a direção efeito tenha

vido favorável ao controle, não foi observada diferença estatística entre as intervenções (SMD 1.16, IC 95% -0.80 a 3.12;  $P = 0.25$ ; 3 estudos; 64 animais; Figura 2). A magnitude da heterogeneidade estimada pela estatística  $I^2$  foi alta e estatisticamente significativa ( $I^2 = 91\%$ ;  $P < 0.0001$ ; Figura 2).



**Figura 2:** Análise estatística da metanálise realizada em 3 artigos para avaliar a influência do exercício aeróbio na força diafragmática em animais com IC. Comparação do efeito do ‘exercício Vs. controle’ na força do músculo diafragma. A magnitude da heterogeneidade estimada pela estatística  $I^2$  foi alta e estatisticamente significativa ( $I^2 = 91\%$ ;  $P < 0.0001$ ).

Dos estudos incluídos na metanálise, o estudo de Bowen et al., 2017 (artigo 1) utilizou ratos espontaneamente hipertensos, diabéticos e obesos (ZSF1), que apresentavam IC, os animais do grupo IC sedentário ( $n=13$ ) não realizaram exercício, e animais do grupo treino contínuo ( $n=11$ ) com 20 semanas iniciaram um protocolo de exercício aeróbio, 5x/semana a 60%  $VO_{2max}$  durante 1 hora, por 8 semanas. A força do diafragma foi mensurada *in vitro* e não foi observado melhora na função contrátil<sup>17</sup>.

Em estudo publicado por Mangner et al., 2013 (artigo 2), realizado em camundongos fêmeas, obesas, espontaneamente hipertensas e diabéticas C57Bl6, com IC, que com idade de dois meses, foram randomizados para os grupos, sedentário (controle,  $n=20$ ) e treinamento físico ( $n=20$ ). Após um período de quatro semanas, os camundongos foram aleatoriamente injetados por via intraperitoneal



com 100 ng/g de TNF- $\alpha$  recombinante (n=10) ou com um volume igual de solução salina (n=10). O animais foram treinados 5x/semana a uma velocidade de 15 m/min, inclinação à 5 graus, com intervalos de descanso de 2 minutos a cada 15 minutos durante 60 min/dia, por 4 semanas. A força diafragmática foi mensurada por meio de estimulação elétrica. Os animais sedentários TNF- $\alpha$  apresentaram diminuição de força de 42%, e o treinamento físico aboliu totalmente a perda de força no músculo diafragma <sup>7</sup>.

O estudo de Mangner et al., 2016 (artigo 3) foi realizado em camundongos fêmeas, que foram submetidas a um infarto do miocárdio (IM) para induzir IC, e divididos de forma randomizada para grupos sedentário IC (n=10) ou IC com treinamento físico aeróbio (n=10). O exercício foi realizado em esteira rolante e iniciado 1 semana após a cirurgia, sendo realizado 5x/semana a 15m/min com inclinação de 15 graus por 1 hora, por um total de 9 semanas. A força do diafragma foi mensurada in vitro e os camundongos IC sedentários desenvolveram fraqueza muscular de 20% comparado com Sham, mas isso foi prevenido pelo exercício aeróbio <sup>9</sup>.

### **Avaliação do risco de viés**

Os resultados referentes ao Syrcle que avaliaram o risco de viés dos artigos estão descritos na Tabela 2. Podemos observar que dos 10 itens avaliados, o artigo de Bowen et al., 2017 teve pontuação de unuclear em 7. Já Mangner et al., 2013, obteve 6 itens como nuclear e Mangner et al., 2016 foi o que obteve maior pontuação unuclear, 8 no total. A pontuação unuclear se dá quando não estão descritos no trabalho se foi feito ou não os itens avaliados pelo Syrcle.

**Tabela 2.** Aplicação do Syrcle para avaliação do risco de viés.

<b>Syrcle: risco de viés</b>	<b>Artigo 1</b>	<b>Artigo 2</b>	<b>Artigo 3</b>
1. Geração da sequência	Unclear	Unclear	Unclear
2. Características basais	Unclear	Yes	Unclear
3. Ocultação da alocação	Unclear	Unclear	Unclear
4. Alojamento aleatório	Unclear	Unclear	Unclear
5. Cegamento (desempenho)	Unclear	Unclear	Unclear
6. Avaliação aleatória dos resultados	Unclear	Unclear	Unclear
7. Cegamento (detecção)	Unclear	Unclear	Unclear
8. Dados resultados incompletos	Yes	No	Unclear
9. Relatório seletivo	No	No	Yes
10. Outros vieses	Yes	Yes	Yes

## DISCUSSÃO

Esta revisão sistemática teve como objetivo identificar as evidências científicas sobre o impacto do exercício aeróbio na força do músculo diafragma de animais com IC. Os resultados dos artigos indicam que esta modalidade de exercício é controversa, e devido este fato, o resultado desta metanálise constatou que a intervenção (exercício aeróbio) não é favorável na melhora da força diafragmática na IC. Alguns eventos devem ser considerados para ter influenciado para este resultado tenha sido a limitação de estudos encontrados com esta abordagem, pois, como realizamos a metanálise com um número pequeno de artigos (somente 3 estudos) este fato não propicia para que haja um evento favorável. Os artigos foram feitos pelo mesmo grupo de pesquisadores, porém foi feito a metanálise pelo fato dos artigos terem sido realizados em animais com diferentes formas de indução de

insuficiência cardíaca, fato este que descaracteriza o risco de viés de possivelmente utilizarem os mesmos animais para avaliarem desfecho força em artigos diferentes.

Outro fato que pode ter influenciado para que a intervenção não tenha sido favorável deve-se ao fato de termos 3 tipos diferentes de IC: 1) ratos espontaneamente hipertensos, diabéticos e obesos, 2) camundongos fêmeas, obesas, espontaneamente hipertensas e diabéticas (C57Bl6) e 3) camundongos fêmeas, que foram submetidas a um infarto do miocárdio (IM). Sabe-se que a sobrecarga cardíaca é diferente em cada patologia. O artigo 1, a caracterização da IC foi feita pelo ecocardiograma, evidenciando uma disfunção diastólica (confirmado pela pressão diastólica final do Ventrículo Esquerdo (VE) e E/E'), com fração de ejeção preservada e hipertrofia do VE. O artigo 2 utilizou animais espontaneamente hipertensos e diabéticos, e o autor considerou utilizar o TNF- $\alpha$  para a indução da IC, porém ele não fez nenhuma avaliação que caracterizasse a patologia cardíaca, o que dificulta a compreensão em relação a sua gravidade. Já o artigo 3 comprovou a IC com o uso do ecocardiograma, que observou alterações no diâmetro sistólico final, diâmetro diastólico final e pela espessura relativa do VE. Diante do exposto, entendemos que os animais apresentaram diferentes graus de IC, o que pode ter sido determinante no desfecho desta revisão com meta análise.

Uma das principais comorbidades relacionadas com a IC está a miopatia esquelética, que favorece sintomas como falta de ar, fadiga precoce e intolerância ao exercício <sup>18</sup>. Uma das condutas não farmacológicas, nível de evidência 1 e recomendação A para a IC é o Exercício Físico Aeróbio (ExF) <sup>19</sup>. Comumente para ganho de força são utilizados os exercícios resistidos. Em um estudo de revisão sistemática com metanálise observaram que o treinamento resistido

aumenta a força muscular, a capacidade aeróbia e a qualidade de vida em pacientes com IC<sup>20</sup>.

Entretanto, na última atualização da American Heart Association sobre exercícios de resistência e aeróbios foi realizada uma comparação entre estas modalidades, onde observaram que ambas provocam melhora na aptidão física, e destacam que o exercício aeróbio além de provocar maiores benefícios na capacidade aeróbia e cardiorrespiratórias, também influencia no ganho de força muscular, atuando de forma efetiva nos fatores de risco para as patologias cardiovasculares<sup>21,22</sup>. Devido a importância do exercício físico na reabilitação cardíaca e seus benefícios nas complicações periféricas, buscamos estudos que avaliaram essa modalidade para a miopatia diafragmática na IC.

A avaliação do risco de viés avaliado pelo Syrcle pode-se notar informações incompletas que não permitem aos pesquisadores mensurarem de forma clara os cuidados metodológicos ao realizar esse tipo de pesquisa. Observamos que os 3 estudos desta metanálise obtiveram 7, 6 e 8 itens pontuados como unclear (respectivamente), isto evidencia que os estudos pré clínicos não são tão criteriosos metodologicamente deveriam seguir recomendações padronizadas como aplicação do ARRIVE, e não seguem essas recomendações sistematizadas como ocorre em artigos de seres humanos. Isso é importante para estimular os pesquisadores que utilizam modelo animal a seguirem recomendações internacionais metodológica mais criteriosas, pois este guia foi desenvolvido para melhorar o desenho, a análise e o manuscrito de pesquisas realizadas em animais<sup>23</sup>.

Nesta revisão composta de 3 artigos, observamos que o exercício aeróbio manteve um padrão em relação a frequência do exercício. Todos os artigos

realizaram exercício aeróbio 5x/semana com duração de 1 hora cada, o que diferiu entre eles foi o tempo de treinamento. Bowen 2017 realizou 8 semanas de exercício aeróbio, já Mangner 2016 realizou 9 semanas de intervenção e Mangner 2013 realizou somente 4 semanas. Nos estudos de Mangner 2013 e 2016 o exercício evidenciou efeito benéfico na força do diafragma em animais com IC, onde realizaram a mesma frequência e intensidade de exercício ( $v=15\text{m/min}$ ), porém, com diferentes tempos de treinamento. Já o estudo de Bowen et al., 2017 a intensidade do exercício foi estipulada através  $60\% \text{VO}_2\text{max}$  e o exercício aeróbio não teve efeito na força diafragmática, mas, no mesmo estudo, Bowen realizou um protocolo de exercício intervalado de alta intensidade (HIIT) e esta modalidade de exercício atuou melhorando a força do músculo diafragma.

Em outro estudo de revisão sistemática com metanálise que avaliou a eficácia do exercício aeróbio na IC reforçou os dados encontrados na literatura, que evidencia esta modalidade de exercício como eficaz, porém acrescentaram que para ter um melhor desempenho é necessário que a execução do exercício deva ser progressivo, ao invés da manutenção da mesma carga de esforço ao longo do período de treinamento, entretanto, não foi possível identificar qual a melhor intensidade ou progressão são mais eficazes <sup>24</sup>. Acreditamos que além do número reduzido de estudos com esta temática, um dos fatores determinantes que influenciou nesta metanálise não ser favorável a intervenção tenha sido a manutenção da intensidade do exercício durante todo o tempo de treinamento nos artigos. O exercício aeróbio frequentemente é indicado para ganho de aptidão cardiorrespiratória e não para ganho de força muscular. Entretanto, a sobrecarga imposta a esse músculo pelo aumento da frequência respiratória, e assim maior

incursões diafragmáticas podem interferir benéficamente no recrutamento de fibras musculares, otimizando assim ganho de força <sup>21</sup>.

De acordo com a Diretriz de IC a reabilitação cardiovascular o exercício aeróbico na IC possui classe I e nível de evidência A que atua na melhora da qualidade de vida e na melhora da capacidade funcional <sup>25</sup>. Entendemos que esta melhora na capacidade funcional está relacionada com a performance diafragmática, que durante o exercício favorece o ganho de força diafragmática.

As principais limitações dos resultados desta revisão sistemática são a inconsistência e a imprecisão. Os resultados indicaram inconsistência na estimativa de efeito: (1) os intervalos de confiança não sobrepõem os efeitos estimados dos estudos incluídos; (2) há alta variabilidade na estimativa de efeito entre os estudos; (3) a magnitude da heterogeneidade é alta e significativa. Analisando a Figura 2, constatamos que há evidências de imprecisão: (1) intervalo de confiança para a estimativa agrupada (metanálise) não é consistente com o exercício ou grupo controle; (2) a magnitude do tamanho mediano (20 animais) das amostras é baixa; (3) a magnitude do número de estudos (n = 3) incluídos é pequena, limitando análises de viés de publicação.

Contudo, deve ser destacado como força dos resultados desta revisão sistemática a ausência de evidências indiretas e viés de publicação. A análise de evidências indiretas indica que os animais com IC incluídos no estudo tem aplicabilidade no contexto da pesquisa pré-clínica, bem como as intervenções e desfecho testados. Além disso, uma busca ampla foi realizada e sem restrições na seleção de estudos com base no idioma com a finalidade de controlar o viés de publicação.

## CONCLUSÃO

Devido às limitações dos estudos incluídos, mais estudos pré-clínicos são necessários para estabelecer o efeito do exercício aeróbio na força do músculo diafragma em animais com IC.

## AGRADECIMENTOS

Não houve conflito de interesses.

## REFERÊNCIAS

1. Chi J, Li Z, Hong X, et al. Inhalation of Hydrogen Attenuates Progression of Chronic Heart Failure via Suppression of Oxidative Stress and P53 Related to Apoptosis Pathway in Rats. *Front Physiol.* 2018;9. doi:10.3389/fphys.2018.01026
2. Klompstra L, Jaarsma T, Stromberg A. Physical activity in patients with heart failure: barriers and motivations with special focus on sex differences. *Patient Prefer Adherence.* November 2015:1603. doi:10.2147/PPA.S90942
3. Cacciani N, Ogilvie H, Larsson L. Age related differences in diaphragm muscle fiber response to mid/long term controlled mechanical ventilation. *Exp Gerontol.* 2014;59:28-33. doi:10.1016/j.exger.2014.06.017
4. Kelley RC, Ferreira LF. Diaphragm abnormalities in heart failure and aging: mechanisms and integration of cardiovascular and respiratory pathophysiology. *Heart Fail Rev.* 2017;22(2):191-207. doi:10.1007/s10741-016-9549-4
5. Martinez PF, Bonomo C, Guizoni DM, et al. Modulation of MAPK and NF- $\kappa$ B Signaling Pathways by Antioxidant Therapy in Skeletal Muscle of Heart Failure Rats. *Cell Physiol Biochem.* 2016;39(1):371-384. doi:10.1159/000445631
6. Lima ARR, Martinez PF, Damatto RL, et al. Heart Failure-Induced Diaphragm Myopathy. *Cell Physiol Biochem.* 2014;34(2):333-345. doi:10.1159/000363003
7. Mangner N, Linke A, Oberbach A, et al. Exercise Training Prevents TNF- $\alpha$  Induced Loss of Force in the Diaphragm of Mice. Seebacher F, ed. *PLoS One.* 2013;8(1):e52274. doi:10.1371/journal.pone.0052274
8. Bowen TS, Rolim NPL, Fischer T, et al. Heart failure with preserved ejection fraction induces molecular, mitochondrial, histological, and functional alterations in rat respiratory and limb skeletal muscle. *Eur J Heart Fail.* 2015;17(3):263-272. doi:10.1002/ejhf.239
9. Mangner N, Bowen TS, Werner S, et al. Exercise Training Prevents Diaphragm

- Contractile Dysfunction in Heart Failure. *Med Sci Sport Exerc.* 2016;48(11):2118-2124. doi:10.1249/MSS.0000000000001016
10. Smith JR, Hageman KS, Harms CA, Poole DC, Musch TI. Effect of chronic heart failure in older rats on respiratory muscle and hindlimb blood flow during submaximal exercise. *Respir Physiol Neurobiol.* 2017;243:20-26. doi:10.1016/j.resp.2017.05.002
  11. Pearson MJ, King N, Smart NA. Effect of exercise therapy on established and emerging circulating biomarkers in patients with heart failure: a systematic review and meta-analysis. *Open Hear.* 2018;5(2):e000819. doi:10.1136/openhrt-2018-000819
  12. Gomes MJ, Martinez PF, Pagan LU, et al. Skeletal muscle aging: influence of oxidative stress and physical exercise. *Oncotarget.* 2017;8(12):20428-20440. doi:10.18632/oncotarget.14670
  13. Yong M-S, Lee H-Y, Lee Y-S. Effects of diaphragm breathing exercise and feedback breathing exercise on pulmonary function in healthy adults. *J Phys Ther Sci.* 2017;29(1):85-87. doi:10.1589/jpts.29.85
  14. Drevon D, Fursa SR, Malcolm AL. Intercoder Reliability and Validity of WebPlotDigitizer in Extracting Graphed Data. *Behav Modif.* 2017;41(2):323-339. doi:10.1177/0145445516673998
  15. Hooijmans CR, Rovers MM, de Vries RBM, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol.* 2014;14:43. doi:10.1186/1471-2288-14-43
  16. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med.* 2009;6(7):e1000097. doi:10.1371/journal.pmed.1000097
  17. Bowen TS, Brauer D, Rolim NPL, et al. Exercise Training Reveals Inflexibility of the Diaphragm in an Animal Model of Patients With Obesity-Driven Heart Failure With a Preserved Ejection Fraction. *J Am Heart Assoc.* 2017;6(10). doi:10.1161/JAHA.117.006416
  18. Bacurau A V, Cunha TF, Souza RW, Voltarelli VA, Gabriel-Costa D, Brum PC. Aerobic Exercise and Pharmacological Therapies for Skeletal Myopathy in Heart Failure: Similarities and Differences. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:4374671. doi:10.1155/2016/4374671
  19. Sociedade Brasileira de Cardiologia. [Guideline for cardiopulmonary and metabolic rehabilitation: practical aspects]. *Arq Bras Cardiol.* 2006;86(1):74-82. doi:/S0066-782X2006000100011
  20. Giuliano C, Karahalios A, Neil C, Allen J, Levinger I. The effects of resistance training on muscle strength, quality of life and aerobic capacity in patients with chronic heart failure — A meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2017;227:413-423. doi:10.1016/j.ijcard.2016.11.023
  21. American College of Sports Medicine position stand. The recommended quantity and quality of exercise for developing and maintaining



- cardiorespiratory and muscular fitness in healthy adults. *Med Sci Sports Exerc.* 1990;22(2):265-274.
22. Williams MA, Haskell WL, Ades PA, et al. Resistance Exercise in Individuals With and Without Cardiovascular Disease: 2007 Update. *Circulation.* 2007;116(5):572-584. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.185214
  23. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol.* 2010;8(6):e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.1000412
  24. Travençolo C, Goessler K, Poton R, Pinto RR, Polito MD. Medida do desempenho físico por testes de campo em programas de reabilitação cardiovascular: revisão sistemática e meta-análise. *Rev Port Cardiol.* 2018;37(6):525-537. doi:10.1016/j.repc.2017.07.008
  25. Rohde LEP, Montera MW, Bocchi EA, et al. Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica e Aguda. *Arq Bras Cardiol.* 2018. doi:10.5935/abc.20180190

## ANEXO A- NORMAS DA REVISTA DO ARTIGO EXPERIMENTAL

### Revista: Experimental Physiology

#### Research Papers

The usual format for research papers is:

- [Title Page](#)
- [New Findings](#)
- [Abstract](#)
- [Introduction](#)
- [Methods](#)
- [Statistics](#)
- [Results](#)
- [Data Deposition/Accessibility of Sequence Data](#)
- [Discussion](#)
- [References](#)
- [Additional Information](#)
- [Competing Interests](#)
- [Author Contributions](#)
- [Funding](#)
- [Acknowledgements](#)
- [Tables](#)
- [Figures and Legends](#)
- [Supporting Information](#)
- [Cover Figures](#)

All submissions should fulfil our [scope](#) and embrace the journal's orientation of translation and integration. Footnotes are not acceptable.

Papers should be written as clearly and concisely as possible and figures and tables should be kept to the minimum necessary to illustrate the hypothesis being tested and support the conclusions. There are no absolute restrictions on the length of Research submissions but 6,000 words including legends and references is normally sufficient. Where there are clear and compelling reasons, a more extensive manuscript will be considered subject to the agreement of the Editor.

#### Title Page

The title page should include Title/Authors/Addresses/Additional information as listed below.

**Title.** The title should normally contain no more than 150 characters (including spaces). Include the species, tissue, organ or system if this is important in the context of the findings. Avoid specialist abbreviations if possible. For abbreviations and symbols that are acceptable in the title see [List 1](#). Titles should be drafted carefully to indicate broadly what the paper is about to all *Experimental Physiology* readers, including those who are not specialists in the field.

For suggestions on how to optimize your title for search engines see <http://www.wiley.com/legacy/wileyblackwell/pdf/SEOforAuthorsLINKSrev.pdf>

**Authorship.** The Editorial Board endorses the general principles set out in Guidelines on Good Publication Practice produced by the Committee on Publication Ethics ([COPE](#)). The author submitting a manuscript must confirm that all persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed, and that all authors have approved the final version of the paper. Each author should take responsibility for a particular section of the study and have contributed to writing the paper (see [Author contributions](#)). Acquisition of funding or the collection of data does not alone justify authorship; these contributions to the study should be listed in the Acknowledgements.

Additional information such as 'X and Y have contributed equally to this work' may be added as a footnote on the title page.

If authorship of a manuscript changes during the publication process, notification of the change, signed by all authors must be sent to the [Publications Office](#).

The editorial process cannot proceed until this notification is received.

**Addresses.** Authors should provide the minimum address information consistent with clarity and should ensure that author affiliations are clearly indicated.

**Additional information.** The following information is also required on the title page:

- A running title not exceeding 70 characters and spaces for page headings.
- Three key words for use in the reviewing process.
- The total number of words in the paper, excluding references and figure legends.
- The total number of references.
- The name and postal and email addresses for the corresponding author.
- The Subject Area as assigned in the [online submission form](#) for the print and online Table of Contents.

### [New Findings](#)

Authors are required to complete two 'New findings' boxes on the submission form using no more than 100 words in total distributed between the answers to two questions.

For Research articles:

- What is the central question of this study?
- What is the main finding and its importance?

For Case Studies:

- What is the main observation in this case?
- What insights does it reveal?

For Review articles (including Hot Topics, Symposium Reports and Lectures):

- What is the topic of this review?
- What advances does it highlight?

This information will influence editorial handling of the manuscript.

Please include your New Findings questions and answers in your submitted manuscript file as bullet points above the Abstract where they will be published if your article is accepted for publication. Please ensure that your entry is grammatically correct and does not include any undefined abbreviations.

Please see New Findings examples:

['Altered ion transport by thyroid epithelia from CFTR<sup>-/-</sup> pigs suggests mechanisms for hypothyroidism in cystic fibrosis'](#) (click on title for Abstract)

*What is the central question of this study?*

Subclinical hypothyroidism is associated with cystic fibrosis although the mechanisms through which gene mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) produce this effect have not been previously explored.

*What is the main finding and its importance?*

Using well-differentiated primary thyroid epithelial cells cultured from CFTR<sup>-/-</sup> pigs, we show the requirement for CFTR in cAMP-stimulated Cl<sup>-</sup> secretion. Knockout of CFTR also promotes increased Na<sup>+</sup> absorption without increased expression of the epithelial sodium channel. These functional alterations lead to several models for CFTR function in thyroid and suggest mechanisms for cystic fibrosis-induced changes in thyroid function.

[Cerebroprotection by angiotensin- \(1–7\) in endothelin-1-induced ischaemic stroke](#) (click on title for Abstract)

*What is the central question of this study?*

Activation of angiotensin-converting enzyme 2, resulting in production of angiotensin-(1–7) and stimulation of its receptor (Mas), exerts beneficial actions in a number cardiovascular diseases. A potential role for angiotensin-(1–7) in cerebral ischaemic stroke has not previously been reported.

*What is the main finding and its importance?*

We show that pharmacological activation of angiotensin-converting enzyme 2 or central administration of angiotensin-(1-7) attenuates cerebral damage induced by middle cerebral artery occlusion in rats. This role of the angiotensin-(1-7) has not previously been reported and identifies a potential new therapeutic target in ischaemic strokes.

### **Abstract**

This should be in one unnumbered paragraph that accurately reflects the contents of the paper and makes clear the physiological significance of the work, the problem addressed, the nature of the results, and the principal conclusions; authors are expected to conclude the summary by explaining the conceptual novelty and the broader physiological importance of their work. Results should be presented quantitatively where appropriate, together with the statistical significance, and the conclusions indicated. References may not be cited. Since the Abstract may be used by abstracting services, a limit of 250 words is recommended. It must not exceed 5 % of the text (excluding references and figure legends), with an absolute maximum of one printed page.

See [Guidelines](#) for optimizing the Title and Abstract of your article for search engines.

### **Introduction**

The Introduction should make the background and the object of the research clear, indicate the justification for the work and be understandable to the non-specialist. Reference to the authors' previous work is desirable only if it has a direct bearing on the subject of the paper; an extensive historical review is not appropriate.

### **Methods**

Please read our policies regarding [Animal Experiments](#) and [Human Experiments](#).

A detailed explanation of the journal's principles and guidelines on animal experimentation, which includes a checklist for authors, is given in 'Principles and standards for reporting animal experiments in *The Journal of Physiology* and *Experimental Physiology*' by David Grundy, *Experimental Physiology*. doi: 10.1113/EP085299.

Methods should be described once only and should not appear in the legends to figures and tables. Details should be sufficient to allow the work to be repeated by others.

The Methods section should start with a paragraph headed 'Ethical Approval'. Animal studies must meet a minimum set of requirements. A checklist outlining these requirements and detailing the information that must be provided in the paper can be found [here](#). Please note that ether is not an acceptable anaesthetic as it no longer complies with the principle of best practice.

Authors should demonstrate in their Methods section that their experiments comply with the policies and regulations set out in the editorial.

If experiments were conducted on humans, authors must provide confirmation that informed consent was obtained, preferably in writing, that the studies conformed to the standards set by the latest revision of the Declaration of Helsinki (or the version that was in place at the time of the experiments), and that the procedures were approved by a properly constituted ethics committee, which should be named. If the research study was registered (clause 35 of the Declaration of Helsinki) the registration database should be indicated, else the lack of registration should be noted as an exception (e.g. the study conformed to the standard set by the Declaration of Helsinki, except for registration in a database). More information can be found [here](#).

Authors must include the reference number from their Institutional Ethics Committee Approval form or if no number has been provided, give details of who has issued the 'Letter of approval' and on what date.

Authors working on isolated tissues, including primary cell cultures, must state whether the donor animal was anaesthetised or killed, and give details of the relevant procedures. Where tissues are obtained from an abattoir or similar establishment the method of killing need not be specified unless scientifically important.

Ethical information must be included for each manuscript. It is not sufficient to refer to previous publications for details, unless the paper is one of a series published in the same issue.

Where appropriate, lists of solutions, chemicals and equipment, and an explanation of data handling procedures may be given as separate headed paragraphs. The maker's name should be given for all non-standard chemicals, apparatus and equipment. Please see below for more information on the use of antibodies. Materials known by a trade name, e.g. Perspex, have the initial letter as a capital. The Latin names as well as the common name of non-mammalian species should be given.

Please state access codes for data deposition (e.g. protein/DNA/RNA sequences, macromolecular structures) and where relevant, indicate where computer source codes can be obtained.

All articles that use antibodies must provide the following information:

- The source of antibodies, including company name, distributor, developer.
- A representative full blot detailing the validation of each antibody used in the study for protein specificity, excluding loading controls. Lanes on the blot should be labelled to note the nonspecific and specific bands and the positive and negative controls. Exposure time should be indicated.
- Proof for antibody specificity. If specificity data have already been published, authors need not repeat the experiment, but reference where the validation has been published previously. This should be within a peer-review publication and not a manufacturer's site.

Experimental Physiology is pleased to support the National Institutes of Health Rigor and Transparency [Guidelines](#). To comply, we ask that authors include Research Resource Identifiers (RRID's) for all "Key Biological Resources", which include antibodies, cell lines, model organisms and software tools used in the study. To help our authors transparently cite resources there is a single [website](#) where research resources can be found and a "cite this" button under each resource that should be included in the methods section of your manuscript. Several examples of properly formatted methods text can be found below:

- Antibodies: "Sections were stained with a NeuN antibody (Millipore Cat# MAB377, Lot#307 RRID:AB\_2298772)".
- Cell Lines: "Subjects include the following cell line obtained from the CLS cell repository, CLS Cat# 300384/p699\_HeLa\_S3, RRID:CVCL\_0058".
- Organisms: "Subjects in this study were Tlx3 transgenic mice obtained from MMRRC (RRID:MMRRC\_036547-UCD)".
- Software tools: "...terminals were mapped with a computer-assisted mapping program (Neurolucida, v10, RRID:SCR\_001775)".

Please find all of the antibodies, organisms, cell lines and software tools that you have used in the course of this study and add the RRID for each in the methods

section. If you need help with either finding a resource or registering a new resource, the help desk on SciCrunch is staffed and you should hear back within one business day.

Please note, searching the website by catalogue or stock number is usually most effective in quickly retrieving the correct resource.

## Results

Presenting the data. Data may be better presented graphically than in tables. Where possible, graphs should show individual values, rather than solid bars indicating a mean value. If a plot of individual values obscures some of the data presented, a box and whisker plot can be used to show mean or median, and 95% confidence intervals or quartiles.

Describing the samples. To characterise a normally distributed sample, report the mean (SD), and the number of samples (n). Use an appropriate number of significant figures. If samples are not normally distributed, use median and quartile values, or transform the data to obtain a more normal distribution. When describing the precision of estimation of a mean value, 95% confidence limits of the mean should be used, rather than the SEM.

Clearly indicate any inclusion or exclusion criteria. State whether the experimenter was 'blinded' to the experimental conditions, if applicable.

Comparing data. To express a difference between a control group and treated group, state the mean values, the estimated difference between the measurements, and the confidence limits of this difference. Since a common significance level for P is taken to be 0.05, the common confidence limits used are the 95% intervals.

Do not state that there is no difference between samples unless you are confident that the test has sufficient power to allow this conclusion. If necessary, indicate the power of the test, to distinguish absence of evidence from evidence of absence.

Statistical tests. Tests of significance should be specified on each occasion and in full, e.g. Student's paired t test. Use the exact P value, to the appropriate number of decimals, particularly when values are near a stated limit. For example,  $P = 0.051$  and  $P = 0.049$  have very similar implications.

*Experimental Physiology* has published [a series of advisory editorials on statistical reporting](#).

Please note that *Experimental Physiology* will ask authors at the revised manuscript stage to submit complete, original western blot images if they are not included in the manuscript. These should be uploaded as 'Supporting information for review process



only'. Please ensure that in the original gel image provided, the relevant blots are highlighted and that these images are correctly labelled .e. Fig 1A, Fig 2C etc. This is to ensure that the original gel images can be directly compared to the manuscript figures, which should also be marked with figure labels.

### **Data Deposition/Accessibility of Sequence Data.**

*Experimental Physiology* is committed to encouraging the free exchange of scientific information and to promote progress in all areas of physiological research. *Experimental Physiology* requires, as a condition for publication, that nucleic acid and protein sequences, microarray data and data obtained using high throughput sequencing techniques, which support the results in the paper, should be archived in an appropriate public database, 'Nucleic acid and protein sequences and microarray data must be deposited in an appropriate public data base (see below) and must be accessible without restriction from the date of publication.

An entry name or accession number, together with a direct link, must be included within the Methods section in the final version of the manuscript. Microarray data should be MIAME compliant (for guidelines, see <http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html>). FGED (The Functional Genomics Data) Society: MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment). The public repositories ArrayExpress at the EBI (UK), GEO at NCBI (US) and CIBEX at DDBJ (Japan) are designed to accept, hold and distribute MIAME compliant microarray data. Exceptions may be granted at the discretion of the Editor, e.g. for sensitive information that might compromise the anonymity of human subjects.

Examples of suitable databases:

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>),  
 EMBL (<http://www.ebi.ac.uk>),  
 DNA Data Bank of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>)  
 Protein Data Bank Japan (PDBj, <http://www.pdbj.org>)  
 Protein Databank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>)  
 Worldwide Protein Data Bank (wwPDB, <http://www.wwpdb.org>)  
 UniProtKB/Swiss-Prot ([http://web.expasy.org/docs/swiss-prot\\_guideline.html](http://web.expasy.org/docs/swiss-prot_guideline.html))

**Data files on FigShare - <https://figshare.com/>**

Authors are encouraged to upload their data files on FigShare as an alternative or addition to publishing it as 'Supporting information'. Before uploading data to FigShare, authors should find the 'DOI Link' in their acceptance email and include it in the upload (as a reference) to establish a link from the FigShare data back to the published article. After uploading data to FigShare authors should send the DOI/url

link provided by Figshare to the publications office so that it can be included in the final published version of their manuscript.

### Discussion

The Discussion, which follows the Results section, should be separate from it. The assumptions involved in making inferences from the experimental results should be stated. The Discussion should not merely recapitulate the results. Authors should provide a succinct conclusion to their work and are encouraged to conclude the Discussion by expressing an opinion on the relevance of the results in the context of work cited in the paper.

In appropriate circumstances an Appendix or a Theory section may be accepted where, for example, it is necessary to derive mathematical results required in the paper.

### References

The paper should conclude with a list of the papers and books cited in the text. Authors should avoid an excessive number of references. Normally about 50 should be adequate. The order of references is strictly alphabetical, regardless of chronology.

References should be prepared according to the *Publication Manual of the American Psychological Association* (6th Edition). This means in text citations should follow the author-date method whereby the author's last name and the year of publication for the source should appear in the text. for example, (Jones, 1998). The complete reference list should appear alphabetically by name at the end of the paper.

A sample of the most common entries in reference lists appears below. Please note that a DOI should be provided for all references where available. For more information about APA referencing style, please refer to the APA [FAQ](#). Please note that for journal articles, issue numbers are not included unless each issue in the volume begins with page one.

#### **Journal Article**

##### Example of reference with 2 to 7 authors

Beers, S.R., & De Bellis, M.D. (2002). Neurophysiological function in children with maltreatment-related posttraumatic stress disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 159, 483-486. <https://doi:10.1176/appi.ajp.159.3.483>

Ramus, F., Rosen, S., Dakin, S.C., Day, B.L., Castellote, J.M., White, S., & Frith, U. (2003). Theories of developmental dyslexia: Insights from a multiple case study of dyslexic adults. *Brain*, 126(4), 841-865. <https://doi:10.1093/brain/awg076>

#### Example of reference with more than 7 authors

Rutter, M., Caspi, A., Fergusson, D., Horwood, L.J., Goodman, R., Maughan, B., ... Carroll, J. Sex differences in developmental reading disability: New findings from 4 epidemiological studies. *Journal of the American Medical Association*, 291(16), 2007-2012. <https://doi:10.1001/jama.291.16.2007>

#### **Book Edition**

Bradley-Johnson, S. (1994). *Psychoeducational assessment of students who are visually impaired or blind: Infancy through high school* (2nd ed.). Austin, TX: Pro-ed.

[Citethisforme](#) is a free online site which converts reference material into different referencing styles

Unpublished material may be referred to sparingly in the text, by giving the authors' initials and names followed by 'unpublished observations' or 'personal communication'; such citations should not appear in the list of references. References cited as being 'in press' must have been accepted for publication, and the name of the journal or publisher included in the reference list.

#### **Citation of Preprints**

Experimental Physiology allow authors to cite preprint articles in their submitted articles as long as the source is stated clearly.

Preprints deposited in bioRxiv should be cited using their digital object identifier (DOI). Example: Author AN, Author BT. 2013. My article title. bioRxiv <https://doi.org/10.1101/123456>

#### **Additional Information**

All manuscripts must contain a statement regarding Competing interests, Author contributions and Funding. If you have no competing interests or have not receiving funding, statements to this effect must be included. This will be published under a section entitled Additional Information at the end of the paper. You may also add any Acknowledgements in this section.

#### **Footnote - Preprint Publication**

If your submitted article has been published on a not for profit subject based preprint server (e.g. bioRxiv) please provide a foot note stating that this article was first published as a preprint and provide full citation using the digital object identifier (DOI). Example: This article first appeared as a preprint: Author AN, Author BT. 2013. My article title. bioRxiv <https://doi.org/10.1101/123456>

### Competing Interests

All manuscripts must contain a statement regarding Competing interests. If there are no competing interests, a statement to this effect must be included. Authors should disclose any conflict of interest in accordance with [Journal Policy](#).

### Author Contributions

Author contributions This section must state the laboratory where the experiments were performed and list the contribution (in words) of each author (using their initials) to the following aspects of the study:

- 1. Conception or design of the work
- 2. Acquisition, analysis, or interpretation of data for the work
- 3. Drafting of the work or revising it critically for important intellectual content

All authors must have contributed to 1 or 2 AND 3.

It must also confirm that all authors:

- 4. Approved the final version of the manuscript
- 5. Agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

and that

- 6. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

Contributors who do not meet the above criteria for authorship should not be listed as authors, but have their contribution (such as acquisition of funding; general supervision of a research group or general administrative support; and writing assistance, technical editing, language editing, and proofreading) listed in the Acknowledgements.

Additional information such as 'X and Y have contributed equally to this work' may be added as a footnote on the title page.

## **Funding**

Authors must indicate all sources of funding, including grant numbers. If authors have not received funding, this must be stated.

It is the responsibility of authors funded by the UKRI to adhere to their [policy](#) regarding funding sources and underlying research material. The policy requires funding information to be included within the acknowledgements section of a paper. The policy also requires all research papers, if applicable, to include a statement on how any underlying research materials, such as data, samples or models, can be accessed. The UKRI supports the principles outlined in the [Concordat on Open Research Data](#), recognising that research data wherever possible should be made openly available. However, the policy does not require that the data must be made open. If there are considered to be good or compelling reasons to protect access to the data, for example commercial confidentiality or legitimate sensitivities around data derived from potentially identifiable human participants, these should be included in the statement.

## **Acknowledgements**

Acknowledgements should be the minimum consistent with courtesy. The wording of acknowledgements of scientific assistance or advice must have been seen and approved by the persons concerned.

## **Tables**

Tables should be used sparingly. They should be referred to in the text by arabic numerals, e.g. Table 3. Each table should have its own self-explanatory title. The same information should not be presented in both tabular and graphical forms. Tables will be processed as text and therefore should NOT be submitted as figures.

Please see [full instructions](#) for figures

Authors are encouraged to submit coloured illustrations when they enhance the scientific value of the paper. All colour figures are FREE. *Experimental Physiology is an online journal.*

## **Supporting Information**

To facilitate compliance with UKRI and NIH Guidelines *Experimental Physiology* authors are encouraged to upload supporting data files containing the individual results represented in the published figures or tables as means (SD), means (95% confidence interval), or medians ( $\pm$  interquartile range). The files should be clearly labelled and will not be peer reviewed. All supporting data should be submitted with the original manuscript and referred to in the relevant section of the

main text. Authors are encouraged to upload their data files on FigShare. [Click here for more information.](#)

Authors may also include videos, 3-D structures/images that may substantially enhance the importance of the research and be of benefit to readers, but which is not essential for the understanding of the paper.

Any information essential for the full understanding of the manuscript must be incorporated into the article itself as part of the text or as standard figures or tables.

Authors should supply supporting information 'for review purposes only' (which will not be published) highlighting any [overlapping articles](#) or other information necessary to review the manuscript.

See full [Supporting information](#) guidelines for further information.

### **Cover Figures**

Authors are encouraged to provide a figure for possible use on the cover although there is no guarantee that it will be selected. It need not necessarily appear in the paper but should be related to it. It should be uploaded as a supplementary file and referred to in the cover letter. The figure must not have appeared or been submitted elsewhere. The most effective figures for use on the cover are simple (all labelling is removed) and colourful see [previous covers](#).

## **ANEXO B- NORMAS DA REVISTA DO ARTIGO REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE**

### **Revista: International Journal Experimental Pathology**

Author Guidelines The International Journal of Experimental Pathology (formerly the British Journal of Experimental Pathology) has been published continuously since 1920. It has been published in an online only format since January 2014.

Aims and Scope Experimental Pathology encompasses the use of multidisciplinary scientific techniques to investigate the pathogenesis and progression of pathologic processes. The International Journal of Experimental Pathology - IJEP – aims to publish high quality papers which afford new and imaginative insights into Experimental Pathology, thus helping to elucidate further the mechanisms which underlie disease.

Founded in 1920 by the late Paul Fildes (as the British Journal of Experimental Pathology), IJEP has contributed several major advances to the biomedical science literature, ranging from the original penicillin observation:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2566493/> to the first report of the animal model of Ebola virus:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7547435>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1997188/>

In order to continue to achieve this aim IJEP considers for publication papers across a broad spectrum of investigative approaches. This can be in the form of in vitro studies, animal models, and clinical research.

The key objectives are (i) to report on work that addresses the common theme of mechanism at a cellular and molecular level; and (ii) to interpret this work both as a scholarly scientific report per se, and in a translational context. Thus, IJEP provides a forum for publication about pathology and aetiology of both human and veterinary diseases, both acute and chronic inflammatory processes (infective and noninfective), toxicological and traumatic injury, degenerative and iatrogenic disease, fibrosis and cancer.

There are three forms of IJEP publication: (i) original research papers reporting directly on experimental investigations; (ii) review papers (both contributed and commissioned) and (iii) letters to the Editor about topics that have been covered in the Journal, to which authors are invited to respond.

With regard to original papers, based upon the aims and objectives outlined above, IJEP appreciates that a wide range of methods may need to be incorporated into the text. The emphasis is on hypothesis driven investigations, rather than on case reports and descriptive studies.

There is a long IJEP tradition of publishing review papers. Sometimes these focus on individual themes. For example, the most “long-lived” IJEP review paper explored animal models of steatohepatitis:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0959-9673.2006.00465.x/abstract> and another recent review looked at the molecular models that are important in the study of muscular dystrophy.

Others are published as a series: themes have included angiogenesis, renal disease experimental models, and tendon biology and pathology.

IJEP has traditionally taken an interest in the connective tissue microenvironment – its structure, and its relationship to the dynamic processes, often chronic, that occur within it, as well as the pathology of the tissues themselves. The relationship between the tissue site, cell and matrix, inflammation and scarring, has been explored at many different sites, particularly the lung and the synovial joint. Furthermore, IJEP sponsors and publishes the Fell Muir Award lecture series in this field, organised by the British Society for Matrix Biology.

IJEP pays particular attention that research reported conforms to currently accepted ethical standards; that conflicts of interest are declared; and that funding sources and other forms of assistance are acknowledged. Further details about how these aspects should be addressed are discussed below.

## 2. English Language

Requirements IJEP is unable to undertake corrections of language, which is the responsibility of the author. Papers will be unsubmitted from the Journal immediately if the paper does not meet these criteria. Papers must be written in clear, concise English. Spelling should follow The Concise Oxford Dictionary of Current English. Avoid jargon and neologisms. Where English is not the first language of the authors, the paper should be checked by a native English speaker. As a service to authors, Wiley can recommend an independent English language editing service to authors to ensure manuscripts are ready for submission. For more details of this service visit: <http://wileyeditingservices.com/en/english-language-editing/>

## 3. Publication Ethics and Policy

3.1 Ethical Policy IJEP pays particular attention that research reported conforms to ethical standards. Information on various issues relating to Publication Ethics are dealt with in the relevant sections below but are outlined in full in a separate document Ethical Policies of the International Journal of Experimental Pathology.



These ethical policies are based on the Best Practice Guidelines on Publication Ethics: a Publisher's Perspective, 2nd edn from Wiley, and the COPE Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal Editors. IJEP is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE). COPE principles are that submission is considered on condition that papers are previously unpublished, and are not offered simultaneously elsewhere; that all authors (defined below) have read and approved the content; that all authors have disclosed financial and other conflicts of interests; and that the work complies with the ethical policies of the Journal having been conducted under internationally accepted ethical standards after relevant ethical review by a designated ethical authority.

### 3.2 Animal Studies

Manuscripts describing studies involving animals should comply with local/national guidelines governing the use of experimental animals and must contain a statement indicating that the procedures have been approved by the appropriate regulatory body.

### 3.3 Human Studies

Manuscripts concerned with human studies must contain statements indicating that informed, written consent has been obtained, that studies have been performed according to the Declaration of Helsinki, and that the procedures have been approved by a local ethics committee. If individuals might be identified from a publication (e.g. from images) authors must obtain explicit consent from the individuals.

### 3.4 Conflicts of Interest(s)

Statements Conflicts of interest(s) – including a null declaration – are a required section within papers that are published in the Journal.

All authors must include full details of any conflicts of interest in a Conflicts of Interest section. Authors are required to disclose financial interests (e.g. employment, significant share ownership, patent rights, consultancy, research funding, etc.) in any company or institution that might benefit from their publication.

All authors must provide details of any other potential competing interests of a personal nature that readers or editors might consider relevant to their publication. In addition to this section in the manuscript itself, upon acceptance for publication, all authors must supply full details of any such conflicts of interest by e-mailing this to the Journal's editorial assistant Biljana Nikolic [b.nikolic@ucl.ac.uk](mailto:b.nikolic@ucl.ac.uk) .

Note that reviewers are also required to provide information about any Conflicts of Interest. Fuller details about the nature of these statements are in the Ethical Policies of the International Journal of Experimental Pathology.

### 3.5 Funding Statement

All papers must include a Funding Statement section where disclosure of funding sources are included in a separate section within the paper.

All sources of funding must be disclosed. This includes governmental, industrial, charitable, philanthropic and/or personal sources. The key issue is transparency about how the studies described in the manuscript were resourced. Where appropriate funding should be attributed to the relevant author(s).

Examples: This study was funded by a National Health and Medical Research Council of Australia Project Grant (DN-P, FM) and a National Health and Medical Research Council of Australia Senior Research Fellowship (DN-P).

This paper was supported by a grant from the Brazilian agency CNPq (Brazilian National Research and Development Council, Procs. Nr. 301596/2011-5; 475148/2012-6) and FAPEG (Goiás Research Foundation, Procs Nr. 05/2012).

This work was supported by the Uehara Memorial Foundation, Tokyo, Japan and by Grants-in-Aid for Scientific Research (23390480 & 23792512) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Tokyo, Japan.

This work was supported by grants from National Natural Science Foundation of China (No.81272252), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2011656).

### 3.6 Acknowledgements

All papers must include an Acknowledgement section where all acknowledgments are grouped together. The Acknowledgement section may include comments recognising input into the manuscript which is not part of authorship, but is nonetheless helpful. For example, animal welfare, language, scientific guidance, statistical and technical assistance can be recorded in this section.

The authors should acknowledge those who have made substantial contributions to the study or preparation of the manuscript but whose contributions do not fulfil the requirements for authorship – see below.

### 3.7 Authorship

All authors must fulfil the following three criteria:

- Substantial contributions to research design, or the acquisition, analysis or interpretation of data,
  - Drafting the manuscript or revising it critically, and
  - Approval of the submitted and final versions.
4. Manuscript Submission and Review Process

#### 4.1 The Review Process

All submitted manuscripts are subject to review by experienced reviewers, and the reviewers and Editorial Board views are considered by the Editor. Authors may suggest the names of suitable reviewers in a covering letter, or via the website, if they so wish.

The Editor selects and accepts manuscripts suitable for publication - the Editor's decision is final. Manuscripts accepted for publication are copyedited and typeset. The proofs are sent to the Corresponding Author for a final check, but extensive changes to the proofs may be charged to the contributors.

#### 4.2 Conditions of Acceptance

Manuscripts are accepted on the understanding that no substantial part has been, or will be, published elsewhere. All submitted manuscripts will be scrutinised for possible overlap and duplication with already published work. Manuscripts may be subject to editorial revision without notice and remain the copyright of the Journal. If a manuscript that has been returned to authors for revision is not received back in the editorial office after 90 days, it will be treated as a new submission.

The Editor reserves the right to make the final decision whether or not a manuscript is accepted. The author who submits a manuscript for publication is responsible for ensuring that all other authors agree to its submission.

All manuscripts must be accompanied by a covering letter which is approved signed by the Corresponding Author on behalf of all authors. Persons named in the acknowledgements, and those responsible for any personal communications, must have agreed formally to their names so appearing.

#### 4.3 Online Submission

Manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/ijep> In order to submit authors will require a user ID and password, which can be obtained on first use of the submission website. Full instructions are provided when accessing the website.

All file types are supported, but to help the Editor and reviewers view the submission the following types are recommended:

Text: Microsoft Word (.doc or .docx) or generic rich text format (RTF). For details on formats for Tables and Figures submissions, refer to Tables and Figures section: 7.

Manuscript Format. It is strongly recommended that, where possible, authors combine all parts of their submission into a single document.

Alternatively authors may submit the text of the manuscript (including front page, summary, body of text, references and legends to tables and figures) as one

document, with tables and figures as a separate file. Full help and support for online submissions are provided by e-mail (ts.mcsupport@thomson.com), or telephone (+1 434 964 4100/+1 888 503 1050)

## 5. OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research papers who wish to make their papers available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their paper.

With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the paper is made available to nonsubscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive.

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

All OnlineOpen papers are treated in the same way as any other paper. They go through the Journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

## 6. Copyright

When manuscripts are accepted, the authors identified as the formal Corresponding Author for the manuscript will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the manuscript.

For authors signing the copyright transfer agreement If the OnlineOpen option is not selected, the Corresponding Author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign.

The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below: CTA Terms and Conditions [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) For authors choosing OnlineOpen If the OnlineOpen option is selected, the Corresponding Author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

- Creative Commons Attribution License OAA
- Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

- Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services

[http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

See the Online Open section below for more information. If the OnlineOpen option is selected, and the research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK), the Corresponding Author will be given the opportunity to publish the paper under a CC-BY license to comply with The Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

## 7. Manuscript Format

Manuscripts must be saved for submission in double spaced format. The date of submission used will be the date of submission of the electronic text version. Authors are advised to keep a copy of all manuscripts, as no responsibility can be accepted for loss.

The text should follow the following format:

Front page:

A single 'front page' must give:

- (1) the title of the manuscript;
- (2) a short running title (not exceeding 40 characters);
- (3) the name(s) of the author(s) including forename and surname;
- (4) the department(s) in which the work was done; and
- (5) the name, full postal address, fax number and e-mail address of the author to whom the proofs and requests for offprints should be sent, to be headed 'Correspondence'.

The Corresponding Author should take responsibility for communicating with all other authors and getting their approval for the final version to be published. During online submission Corresponding Authors can nominate an individual, who may or may not be an author, to assist them with administration of the publication process.

The Corresponding Author should confirm that all listed authors meet ICMJE authorship criteria and that nobody who qualifies for authorship has been excluded. See Section 3.5 Authorship.

Second page:

The second page should contain a summary paragraph which should give a factual account of the context in which the study has been performed, the objective(s), methods and results, and a brief conclusion, in not more than 250 words. For reviewing and indexing purposes, up to six 'keywords' related to subjects discussed in the paper should be identified and included at the foot of the summary.

### Original Research Papers

Reports of original work should usually be arranged in the conventional order of introduction, methods, results, discussion, acknowledgements and references, with suitable headings for each part. Further sub-divisions, with appropriately less significant headings, can be used. Results may be presented in the text, in tables and figures, but the text should, in general, comment on rather than repeat information in tables.

### Review Papers

Review papers will usually be commissioned, but the Journal also accepts submissions that have not been solicited. For unsolicited reviews, authors are advised to consult the Editor in advance. Once the Editor has agreed to consider a review paper, the guidelines for submitting online are the same as for an original research paper.

### Letters to the Editor

Correspondence which relates to papers which have recently appeared in the Journal may be published. The Editor reserves the right to invite a response from the original authors for publication alongside. Letters should be as short as possible (but no more than 1000 words of text, two figures or tables or one of each, and up to 10 references). Correspondence to the Journal is accepted on the understanding that the contributing author licences the publisher to publish the letter as part of the Journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the Journal and its contents.

### Tables and Figures

For online submission, illustrations should be embedded in the Word document or uploaded as separate files. Quality should be sufficient for viewing on-screen and desktop printing.

Where possible, please provide high quality digital artwork files. Figures: JPEG, GIF, EPS, PNG Microsoft PowerPoint, Microsoft Excel, Microsoft Word are all acceptable. Digital images: Digital versions of figures should be supplied in TIFF format.

Both tables and figures should be numbered consecutively with Arabic numerals. Each should have a separate descriptive legend. Keys should be given in the

legends, not in the figure itself. All illustrations, both drawings and photographs, must be of good quality since delay will result if reviewers need to see improved versions.

As a guide, the ideal figure resolution/specification for various types of original figures, at their final size, is as follows:

#### Line art and diagrams

- Minimum 600 dpi Halftone (both B/W and Colour photographs) - Minimum 300 dpi Line and tone (line art and halftone combined)

- Minimum 600 dpi It is best to use Illustrator or Photoshop software and to save the material in the format '.eps' or '.tif'.

If the author is unable to provide these formats, please save the figures in as many different file formats as possible. For further information on file formats, please see the instructions at <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp>

#### Colour Illustrations

IJEP is published online only and there is no charge for the inclusion of colour figures.

#### Supporting Information

Authors may supply additional text or data as 'Supporting Information Files', but the main manuscript must contain sufficient information to make the work intelligible without these files. Supporting information is a formal part of the published manuscript and should not normally be re-published elsewhere.

Our recommended file types for Supporting Information are: .doc/ .xls/ .ppt/ .txt/ .jpg/ .jpeg/ .gif/ .tif/ .tiff/ .png/ .bmp/ .eps/ .ps/ .html/ .pdf/ .mov/ .mpg/ .wav/ .mp3/ .wma

Please note that Supporting Information is not subedited or proof read, so authors should ensure that files are supplied ready for publication online. File sizes must be as small as possible, so that they can be downloaded quickly and must not exceed 50MB.

#### Measurements

Measurements should be expressed in SI units. If the original observations were recorded in other units, this should be stated, together with the appropriate conversion factors.

#### Standard Abbreviations

Standard abbreviations should be used and should follow those laid down in Units, Symbols and Abbreviations (1994) published by the Royal Society of Medicine. Abbreviations should be used sparingly and only if a lengthy name or expression is

repeated frequently throughout the manuscript. Words must appear in full on first appearance in both summary and text, followed by the abbreviation in parentheses. Drugs should be described by their official names but trade names should be indicated in parentheses the first time the drug is quoted in the text.

### Acknowledgements

Authors are required to include details of ethical approval, disclosure of financial and other conflicts of interest and funding sources.

### References

We recommend the use of a tool such as Reference Manager (Harvard) for reference management and formatting. References must be double spaced and should be made only to papers closely related to the author's work. Exhaustive lists should be avoided. In the text, use the name of the author(s) followed by the date of publication; where there are two authors use the form: Nankivell B.J. & Alexander S.I. (2010) where there are more than two authors use the form: Burandt, E., M. Schreiber, et al. (2014).

Arrange the list of authors quoted at the end of the text in alphabetical order set out as follows:

A) Name(s) and initials of author(s), year of publication (in parentheses), title of the article, name of the journal, volume number, first and last page numbers. Abbreviate journal names according to the Index Medicus system.

B) In the case of books the order is: name(s) and initials of author(s), year of publication (in parentheses), chapter title, full book title, edition, names of the editors, place and name of publisher, and page numbers.

C) Personal communications should be cited in the text of your document only and be accompanied by a letter of permission, They may be referred to in the text (author's name followed by 'unpublished observation' or 'personal communication' .

D) The Journal encourages citation of online papers before they are published in final form when they become available in PubMed or from journal/publisher websites, e.g. Early View articles from the International Journal of Andrology website. The citation must take the following form:

Author(s), Title, Journal, Year; in press (DOI).

Any paper that is In Press but lacks a DOI will not be considered a valid reference citation and cannot be cited.

### Search Engine Optimisation

Many students and researchers looking for information online will use search engines such as Google, Yahoo or similar. By authors optimising their papers for search



engines, this will increase the chance of someone finding their published work. This in turn will make their papers more likely to be viewed and/or cited in another work.

Please see the Tips Sheet for optimising the discoverability of papers and promoting them post-publication, and the Wiley Exchanges blog post for advice on choosing keywords for papers.

## Permissions

Materials copied from other sources must be accompanied by a written statement from both author and publisher giving permission to the International Journal of Experimental Pathology for reproduction. Authors are responsible for obtaining permission in writing from at least one author of papers cited while still in press, as well as of unpublished data and of personal communications. It is the author's responsibility to ensure that permissions are obtained.

## 8. Page Proofs

Proofs will be sent electronically via e-mail as an Acrobat PDF file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: [www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html](http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html) This will enable the file to be opened, read and corrected on screen. Further instructions will be sent at the same time as the proof. Proofs will be posted if no email address is available. In the Corresponding Author's absence, please arrange for a colleague to access this email to retrieve the proofs.

## 9. Early View

The International Journal of Experimental Pathology is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated.

Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue.

After publication in an issue, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

## 10. Author Services

Online production tracking is now available through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their papers - once it has been accepted - through the production process to publication online. Authors can check the status of their papers online and choose to receive automated emails at key stages of production so they don't need to contact the production editor to check on progress. Visit [authorservices.wiley.com/bauthor](http://authorservices.wiley.com/bauthor) for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on paper preparation, submission and more.