

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA

CURSO DE FISIOTERAPIA

Filipe Boeira Schedler

**EFEITOS DA MELATONINA SOBRE O TECIDO PULMONAR NO MODELO
EXPERIMENTAL DE SÍNDROME HEPATOPULMONAR**

Porto Alegre

2015

Filipe Boeira Schedler

**EFEITOS DA MELATONINA SOBRE O TECIDO PULMONAR NO MODELO
EXPERIMENTAL DE SÍNDROME HEPATOPULMONAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção de conceito final na disciplina de TCC II no curso de Fisioterapia da Escola de Educação Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Simões Dias

Porto Alegre

2015

Ao concluir este trabalho, quero agradecer...

...à minha família, que tem me auxiliado na conquista de todos os meus sonhos;

...ao Prof. Dr. Alexandre Simões Dias, que tem confiado em mim desde o começo da graduação;

...a todos os pesquisadores do Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial a Prof^a. Dr^a. Norma Possa Marroni, que continua a abrir portas para que eu desenvolva as minhas atividades como pesquisador.

RESUMO

A Síndrome Hepatopulmonar (SHP) caracteriza-se pela presença da doença hepática, anormalidades nas trocas gasosas e dilatações vasculares pulmonares. O modelo experimental de Ligadura de Ducto Biliar (LDB) é capaz de simular a cirrose hepática e a SHP. Métodos: 14 ratos machos wistar foram divididos em quatro grupos: 1-Grupo Sham: simulação da cirurgia de LDB + NaCl 0,9%; 2- Grupo LDB: LDB + NaCl 0,9%; 3- Grupo Sham + MEL: Sham + Melatonina (20mg/kg); 4- Grupo LDB+ MEL. Foram realizadas a histologia pulmonar e hepática pela coloração de Hematoxilina-Eosina, e a histologia pulmonar pela técnica de picrossirius. A lipoperoxidação pulmonar foi avaliada pelo método das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A atividade enzimática antioxidante pulmonar foi avaliada pela análise da Catalase (CAT) e Glutathione-S-Transferase (GST). Realizou-se a Gasometria Arterial (PaO₂, PaCO₂ e SaO₂), e foi quantificado o O₂ alveolar (PAO₂) e a Diferença Álveolo-arterial de O₂ (D(A-a)O₂). Também foi realizada o cálculo da divisão do peso pulmonar pelo peso corporal para a obtenção da Relação peso pulmonar/ peso corporal (%). Resultados: A histologia confirmou a cirrose hepática e vasodilatação pulmonar no grupo LDB, bem como a fibrose pulmonar pela coloração de picrossirius. Ocorreu melhora da vasodilatação e fibrose pulmonar no grupo LDB+MEL em relação ao LDB. O TBARS (Sham 0.38±0.09; Sham+MEL 0.37±0.15; LDB 0.83±0.13; LDB+MEL 0.5±0.08) e a atividade da GST(Sham 2.54±1.05; Sham+MEL 2.08±1.09; LDB 7.78±1.22; LDB+MEL 3.95±1.99) foram maiores no grupo LDB (p<0.001). A atividade da CAT (Sham 8.32±1.27; Sham+MEL 9.09±1.01; LDB 5.17±0.72; LDB+MEL 8.52±1.14) diminuiu no grupo LDB (p<0.001). A PCO₂(Sham 45±1.4; Sham+MEL 48±5.2; LDB 56.6±1.5; LDB+MEL 48.2±4.5) e PAO₂ (Sham 93.4±1.7; Sham+MEL 89.7±6.6; LDB 78.9±1.9; LDB+MEL 89.4±5.7) estavam alteradas no grupo LDB em relação aos outros grupos (p<0.05). A Relação peso pulmonar/ peso corporal (Sham 0,32±0,09; Sham+MEL 0,34±0,05; LDB 0,57±0,05; LDB+MEL0,37±0,02) se mostrou aumentado no grupo LDB (p<0,01). O grupo LDB+MEL demonstrou valores melhores que o LDB em relação ao TBARS, GST, CAT, PCO₂, PAO₂ e Relação peso pulmonar/ peso corporal. Conclusão: A ação antioxidante da MEL no tecido pulmonar se mostrou eficaz na redução da vasodilatação, fibrose e estresse oxidativo, bem como na melhora da PCO₂ e PAO₂ no modelo experimental de SHP.

Palavras-chave: **Ligadura de ducto biliar. Síndrome hepatopulmonar. Melatonina.**

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	8
2. ARTIGO.....	9
2.1. Carta de Apresentação.....	9
2.2. Informação sobre os autores.....	10
2.3. Resumo	12
2.4. Introdução.....	13
2.5. Materiais e Métodos	14
2.6. Resultados.....	16
2.7. Discussão	18
2.8. Conclusão	20
2.9. Agradecimentos	21
2.10. Referências	22
2.11. Tabelas e Figuras.....	26
3. ANEXOS.....	30
3.1. Instruções para os autores (<i>Revista Portuguesa de Pneumologia</i>)	30

APRESENTAÇÃO

Este trabalho é um dos resultados da minha experiência como bolsista de iniciação científica no Laboratório de Hepatologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Como já estive envolvido em outros projetos de pesquisa similares dentro do grupo de pesquisa, achamos interessante que o meu Trabalho de Conclusão complementasse os outros estudos já realizados.

A ideia de se estudar as alterações pulmonares em um modelo de cirrose já bem estabelecido existe devido à inserção de Fisioterapeutas no grupo de pesquisa experimental no qual atuo. Como estudante de Fisioterapia e orientado pelo Prof. Alexandre Simões Dias, fisioterapeuta, temos interesse principalmente no estudo dos tecidos muscular e pulmonar frente às alterações hepáticas, já que exercemos parte de nossas pesquisas em um centro para estudos do fígado.

O grupo de pesquisa do Laboratório de Hepatologia Experimental do HCPA já realizou diversos estudos avaliando os benefícios de diferentes antioxidantes frente a alterações hepáticas. Dentro deste contexto a Melatonina tem mostrado efeitos extremamente positivos no tratamento da cirrose e reversão das alterações hepáticas. Portanto, tivemos a ideia de verificar se tais efeitos também se apresentariam de maneira similar no pulmão.

A cirrose é uma doença complexa que envolve diferentes sistemas e órgãos. Como fisioterapeutas temos como perspectiva futura desenvolver programas de reabilitação para pacientes cirróticos. No entanto, por se tratar de uma patologia complexa, diversos sistemas têm de ser analisados de maneira integrada para que uma terapia completa e eficaz seja implementada. Portanto, a utilização de antioxidantes pode futuramente estar associada ao exercício físico no tratamento da cirrose hepática.

De maneira resumida, este trabalho avalia os efeitos da melatonina em um modelo experimental de Síndrome Hepatopulmonar (SHP), uma patologia pulmonar típica da cirrose. A avaliação do tecido pulmonar é o foco do estudo, sendo avaliada a histologia, gases sanguíneos, estresse oxidativo e enzimas antioxidantes. A revista escolhida para o envio do artigo é a *Revista Portuguesa de Pneumologia* e, portanto, o artigo segue as normas desta revista.

CARTA DE APRESENTAÇÃO

Os dados referentes ao estudo em questão estão sendo apresentados pela primeira vez neste artigo científico. O estudo recebeu apoio financeiro do Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do HCPA (FIPE-HCPA) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). O presente manuscrito foi lido e aprovado por todos os autores, todos os requerimentos de autoria foram cumpridos, e todos os autores concordam que este artigo científico se trata de um trabalho honesto. O Prof. Dr. Alexandre Simões Dias e a Prof.^a Dr.^a Norma Possa Marroni supervisionaram este estudo em todos os aspectos de sua implementação. Josieli Raskopf Colares, Elizângela Gonçalves Schemitt, Renata Minuzzo Hartmann e Francielli Licks realizaram as análises biomoleculares e indução do modelo experimental. Filipe Boeira Schedler e Adriane Dal Bosco participaram de todas as fases do estudo, desde a indução do modelo experimental, coleta dos dados, análise estatística, bem como da interpretação dos resultados e elaboração do artigo científico.

**EFEITOS DA MELATONINA SOBRE O TECIDO PULMONAR NO MODELO
EXPERIMENTAL DE SÍNDROME HEPATOPULMONAR**

Filipe Boeira Schedler¹, Adriane Dal Bosco², Josieli Raskopf Colares³, Elizângela Gonçalves Schemitt⁴, Renata Minuzzo Hartmann⁵, Francielli Licks⁶, Silvia Bona⁷, Alexandre Simões Dias⁸, Norma Possa Marroni⁹.

¹Acadêmico de Fisioterapia- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); Pesquisador do Laboratório de Hepatologia Experimental- Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Pesquisador do Grupo de Pesquisa Experimental e Clínica em Fisioterapia (GPEC-FISIO) - HCPA.

²Coordenadora do curso de Fisioterapia- Centro Universitário Metodista (IPA); Mestrado em Medicina- Ciências Médicas/ UFRGS; Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Pneumologia- HCPA;

³Mestrado em Biologia Celular e Molecular aplicada a Saúde- Universidade Luterana do Brasil (ULBRA); Pesquisadora do Laboratório de Estresse Oxidativo- ULBRA

⁴Mestrado em Medicina- Ciências Médicas-UFRGS; Pesquisadora do Laboratório de Estresse Oxidativo- ULBRA;

⁵Mestrado em Medicina- Ciências Médicas-UFRGS; Pesquisadora do Laboratório de Estresse Oxidativo- ULBRA;

⁶Mestrado em Ciências Biológicas- Fisiologia-UFRGS; Pesquisadora do Laboratório de Estresse Oxidativo- ULBRA;

⁷Mestrado em Medicina- Ciências Médicas-UFRGS; Doutorado em Medicina- Ciências Médicas- UFRGS; Pesquisadora do Laboratório de Hepatologia Experimental- HCPA;

⁸Mestrado em Ciências Biológicas- Fisiologia/UFRGS; Doutorado em Ciências Biológicas- Fisiologia/UFRGS; Pós-doutorado na Universidad de León; Chefe do Serviço de Fisioterapia- HCPA; Coordenador do GPEC-FISIO- HCPA.

⁹Mestrado em Ciências Biológicas- Fisiologia –UFRGS; Doutorado em Ciências Biológicas- Fisiologia-UFRGS; Pós-doutorado na Universidad de León; Professora coordenadora do Laboratório de Estresse Oxidativo- ULBRA; Professora coordenadora do Laboratório de Hepatologia Experimental- HCPA.

O estudo apresenta mais de seis autores devido a três razões:

- O estudo foi realizado em dois centros de pesquisa;
- O estudo é resultado do trabalho de diversos pesquisadores que exercem suas funções específicas dentro do mesmo grupo de pesquisa e, portanto, produzem em conjunto;
- O artigo apresenta resultados provenientes de um estudo maior que envolve o trabalho de diversos pesquisadores.

*Estudo realizado no Hospital de Clínicas da Porto Alegre (HCPA) e Universidade Luterana do Brasil (ULBRA).

Endereço para contato:

Rua João Salomoni 131 casa 36, bairro Vila Nova, CEP 91740-830, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Tel 55 51 80552210

E-mail: fbschedler@gmail.com

RESUMO

A Síndrome Hepatopulmonar (SHP) caracteriza-se pela presença da doença hepática, anormalidades nas trocas gasosas e dilatações vasculares pulmonares. O modelo experimental de Ligadura de Ducto Biliar (LDB) é capaz de simular a cirrose hepática e a SHP. Métodos: 14 ratos machos wistar foram divididos em quatro grupos: 1-Grupo Sham: simulação da cirurgia de LDB + NaCl 0,9%; 2- Grupo LDB: LDB + NaCl 0,9%; 3- Grupo Sham + MEL: Sham + Melatonina (20mg/kg); 4- Grupo LDB+ MEL. Foram realizadas a histologia pulmonar e hepática pela coloração de Hematoxilina-Eosina, e a histologia pulmonar pela técnica de picrossirius. A lipoperoxidação pulmonar foi avaliada pelo método das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A atividade enzimática antioxidante pulmonar foi avaliada pela análise da Catalase (CAT) e Glutathione-S-Transferase (GST). Realizou-se a Gasometria Arterial (PaO_2 , $PaCO_2$ e SaO_2), e foi quantificado o O_2 alveolar (PAO_2) e a Diferença Álveolo-arterial de O_2 ($D(A-a)O_2$). Também foi realizada o cálculo da divisão do peso pulmonar pelo peso corporal para a obtenção da Relação peso pulmonar/ peso corporal (%). Resultados: A histologia confirmou a cirrose hepática e vasodilatação pulmonar no grupo LDB, bem como a fibrose pulmonar pela coloração de picrossirius. Ocorreu melhora da vasodilatação e fibrose pulmonar no grupo LDB+MEL em relação ao LDB. O TBARS e a atividade da GST foram maiores no grupo LDB. A atividade da CAT diminuiu no grupo LDB. A PCO_2 e PAO_2 estavam alteradas no grupo LDB em relação aos outros grupos. A Relação peso pulmonar/ peso corporal se mostrou aumentado no grupo LDB. O grupo LDB+MEL demonstrou valores melhores que o LDB em relação ao TBARS, GST, CAT, PCO_2 , PAO_2 e Relação peso pulmonar/ peso corporal. Conclusão: A ação antioxidante da MEL no tecido pulmonar se mostrou eficaz na redução da vasodilatação, fibrose e estresse oxidativo, bem como na melhora da PCO_2 e PAO_2 no modelo experimental de SHP.

Palavras-chave: **Ligadura de ducto biliar. Síndrome hepatopulmonar. Melatonina.**

Introdução

A cirrose se caracteriza pela presença de nódulos fibróticos no fígado que surgem como resultado da lesão hepática crônica (1). Tais alterações podem levar à hipertensão portal e à doença hepática terminal, gerando alterações no sistema vascular e afetando diferentes órgãos (1,2). No sistema respiratório a Síndrome Hepatopulmonar (SHP) e a Hipertensão Portopulmonar são as duas principais condições clínicas que afetam os pulmões (2). A Síndrome Hepatopulmonar é a disordem vascular mais comum encontrada em pacientes com cirrose, que é responsável pela vasodilatação pulmonar, circulação hiperdinâmica e alterações nas trocas gasosas (2,3).

Anormalidades nas trocas gasosas apresentadas por pacientes com SHP estão associadas com a presença de *shunts* arterio-venosos, discrepâncias na ventilação-perfusão e na difusão-perfusão (2). Tais alterações presentes na SHP são em sua maioria explicadas pelos processos de angiogênese e vasodilatação intrapulmonar (2), e diferentes modelos animais são utilizados para simular a cirrose hepática, sendo o modelo de Ligadura de Ducto Biliar (LDB) o que melhor simula as alterações presentes na síndrome (4).

O modelo de LDB é capaz de causar alterações gasométricas similares às encontradas em pacientes com SHP (2). O processo de angiogênese também está presente no modelo de LDB, sendo tal alteração presente devido à ação do Fator de Crescimento Vascular Endotelial-A (VEGF-A), o qual é produzido por monócitos pulmonares intravasculares (5,6). A vasodilatação pulmonar no modelo experimental de LDB está associada ao aumento na produção de Endotelina-1 (ET-1) e Óxido Nítrico Sintetase Endotelial (eNOS) (6).

Estudos recentes investigando o potencial terapêutico da Melatonina (MEL) sugerem que seu poder antioxidante pode ser utilizado no tratamento da SHP, pois apresenta efeito anti-inflamatório (7), e reduz níveis de VEGF em células de carcinoma hepático, contribuindo na redução da angiogênese (8). A Melatonina também apresenta efeitos terapêuticos em

modelos animais de hepatite fulminante e hipertensão pulmonar, onde reduz o estresse oxidativo e previne a redução da atividade de enzimas antioxidantes (9,10,11). No tecido pulmonar, a Melatonina exerce efeito protetor em modelos animais de cirrose induzida por tetracloreto de carbono (12).

Devido à existência de um modelo experimental que simule a SHP e ao potencial efeito terapêutico da Melatonina nessa síndrome, este estudo tem como objetivo avaliar as alterações pulmonares de animais submetidos à Ligadura de Ducto Biliar, bem como o efeito antioxidante da Melatonina.

Materiais e Métodos

Neste estudo foram utilizados 14 ratos Wistar machos, pesando 250g em média. Os animais foram obtidos pelo Biotério da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) e foram alojados em caixas plásticas (47 x 34 x 18cm) cobertas por maravalha, as quais eram armazenadas em ambiente controlado com temperatura entre 20 e 25°C. Os animais foram mantidos em um ciclo de claro/escuro de 12/12h, com livre disponibilidade para água e comida. O projeto de pesquisa recebeu aprovação prévia da Comissão de Ética de Uso de Animais da ULBRA (CEUA-ULBRA), estando todos os procedimentos de pesquisa de acordo com as regras estabelecidas pela Lei Nº 11.794, de 11 de outubro de 2008, e pela Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA).

O procedimento de Ligadura de Ducto Biliar Comum (LDBC) foi utilizado para o desenvolvimento da SHP, de acordo com o preconizado por Kontouras (13). Previamente a todos os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam uma dose anestésica de Xilazina 2% (50mg/kg de peso corporal) e Ketamina (100mg/kg de peso corporal), ambos injetados na região intraperitoneal. O período para o desenvolvimento do modelo foi de 14 dias, seguidos

de outros 14 dias para o tratamento com melatonina. O período total de experimento foi de 28 dias, sendo que no momento da realização da eutanásia, os animais receberam uma dose três vezes maior àquela usada para o procedimento cirúrgico.

Utilizou-se no estudo quatro grupos: Grupo *Sham*: Realizado procedimento cirúrgico de LDBC simulado, ocorrendo a manipulação do ducto biliar c/ o animal anestesiado e os animais também receberam injeção intraperitoneal de NaCl (0,9%) a partir do 15º dia após cirurgia, durante 14 dias. Grupo *Sham*+Melatonina (*Sham*+MEL): o procedimento cirúrgico de LDBC foi simulado, e a administração de Melatonina (20mg/kg) ocorreu via injeção intraperitoneal durante 14 dias, iniciando no 15º dia após a cirurgia. Grupo Ligadura de Ducto Biliar (LDB): Os animais foram submetidos à LDBC e à aplicação de NaCl (0,9%) via intraperitoneal por 14 dias, iniciando no 15º dia após a cirurgia. Grupo Ligadura de Ducto Biliar + Melatonina (LDB+MEL): os animais foram submetidos à LDBC e receberam Melatonina (20mg/kg) via injeção intraperitoneal por 14 dias, iniciando no 15º dia após a cirurgia.

Os exames laboratoriais foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), onde as demais análises e procedimentos foram realizadas no Laboratório de Hepatologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Depois de 28 dias após a cirurgia os animais foram pesados e anestesiadas e o sangue foi coletado através da Técnica de Coleta Sanguínea Retro-orbital (14), com o objetivo de analisar os níveis das enzimas hepáticas. Posteriormente, uma laparotomia antero-medial foi realizada para a coleta de sangue da aorta abdominal para a análise gasométrica, sendo utilizado um Radiômetro ABL 700 (*Copenhagen, Denmark*) para a mensuração dos gases sanguíneos. O método da iontoforese foi utilizado para a mensuração da Pressão Parcial de Oxigênio Arterial (PaO₂), Pressão Parcial de Gás Carbônico Arterial (PaCO₂) e Saturação

Arterial de Oxigênio (SaO_2). A Pressão Alveolar de Oxigênio (PAO_2) foi calculada pela seguinte fórmula: $PAO_2 = \text{Fração Inspirada de } O_2 (FiO_2) - PaCO_2 / 0.8$ (15). A Diferença Alvéolo-Arterial de Oxigênio ($D(A-a)O_2$) foi calculada pela fórmula: $D(A-a)O_2 = PAO_2 - PaO_2$ (15).

Após a eutanásia o pulmão foi pesado para posterior análise da relação Peso Pulmonar/ Peso Corporal. Uma porção do fígado e do lobo pulmonar inferior direito foi removida para a realização da análise histológica, sendo o restante do tecido pulmonar introduzido em Nitrogênio líquido e armazenado a uma temperatura de -80°C para posterior análises. Amostras pulmonares e hepáticas coletadas para a análise histológica foram inseridas em solução de Formaldeído 10% por 12 horas, sendo posteriormente inseridas em recipientes de Álcool 70% e coloridas com a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE), amostras pulmonares também receberam a coloração de picrossirius. As análises histológicas foram realizadas de maneira duplo-cega por patologistas específicos do Laboratório de Patologia do HCPA.

O tecido pulmonar congelado foi homogeneizado por um homogeneizador Ultra-Turraz (*IKA Labortechnik, Staufen, Germany*) em tampão fosfato (KCl 140mM, Fosfato 20 nM, pH 7.4). A lipoperoxidação foi mensurada pela técnica das substâncias que reagem ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) (16). As atividades das enzimas Catalase (CAT) e Glutathione-s-transferase (GST) foram medidas através do Espectrofotômetro (17,18).

Médias e Desvios Padrões (DP) foram calculados. Os dados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de *post hoc* de Tukey. Os valores foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0.05$. Foi usado o software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) versão 21.0.

Resultados

A análise da atividade das enzimas hepáticas sanguíneas e da histologia hepática confirmaram o diagnóstico de Cirrose. Na Figura 1 pode ser observado pela análise histológica pulmonar que os animais do grupo LDB apresentaram vasos de diâmetros aumentados em relação aos demais grupos. Uma vez que os achados em cada grupo são muito similares, será apresentado apenas um exemplo histológico de cada grupo experimental.

Na Tabela 1 podem ser observados os resultados referentes às alterações nas trocas gasosas através da Gasometria Arterial, com valores referentes à PaO_2 , $PaCO_2$, SaO_2 , PAO_2 e $D(A-a)O_2$ sendo comparados entre os quatro grupos experimentais. Diferenças significativas foram encontradas para a $PaCO_2$ e PAO_2 , sendo os valores referentes ao grupo LDB significativamente aumentados e diminuídos, respectivamente, em relação aos demais grupos ($p < 0.05$). A Tabela 2 também mostra um aumento significativo ($p < 0,01$) da Relação peso pulmonar/peso corporal no grupo LDB em relação aos outros grupos experimentais.

A vasodilatação intrapulmonar associada às alterações gasométricas confirmam o modelo experimental de SHP. A diminuição da vasodilatação intrapulmonar, da $PaCO_2$ e da Relação peso pulmonar/peso corporal no grupo LDB+MEL, bem como o aumento da PAO_2 em relação ao LDB, sugerem um efeito protetor da MEL no tecido pulmonar frente à SHP.

A Tabela 2 mostra resultados referentes ao processo de lipoperoxidação e atividade das enzimas antioxidantes, caracterizados pelos valores do TBARS, CAT e GST. Os valores aumentados do TBARS no grupo LDB em relação aos outros grupos ($p < 0.01$) indicam um aumento da lipoperoxidação neste grupo experimental. A atividade da CAT foi significativamente menor no grupo LDB ($p < 0.01$), enquanto a atividade da GST no grupo LDB esteve significativamente aumentada em relação aos outros grupos. O grupo LDB+MEL apresentou resultados menores para os valores de TBARS em relação ao grupo LDB, indicando um efeito antioxidante da MEL.

Na Figura 2 um aumento da fibrose pulmonar, marcada pela coloração vermelha, foi encontrado no grupo LDB em relação aos outros grupos. Tal processo foi revertido com o uso da Melatonina, com a fibrose pulmonar se mostrando diminuída do grupo LDB+MEL em relação ao grupo LDB.

Discussão

O aumento no diâmetro dos vasos pulmonares, evidenciada pela análise histológica por HE, em associação com as alterações gasométricas, confirma no presente estudo a indução da SHP através da cirurgia de LDB. A diminuição do diâmetro dos vasos pulmonares no grupo LDB+MEL em relação ao grupo LDB, sugere efeitos terapêuticos da Melatonina no processo de adaptação vascular.

De acordo com nossos resultados a PaCO_2 aumentou no grupo LDB em relação aos demais grupos, enquanto a PAO_2 diminuiu no mesmo grupo. Vercelino e colaboradores (4) também encontraram um aumento da PCO_2 no grupo LDB quando comparado ao grupo controle, bem como alterações adicionais no grupo LDB, com alterações nos valores de PaO_2 , SaO_2 e D(A-a)O_2 . Diversos estudos associam as alterações gasométricas presentes na SHP com a ação de Óxido Nítrico (ON) no tecido pulmonar (19,20). Tieppo e colaboradores (21) constataram que a ação antioxidante da Quercetina é capaz de reverter as alterações gasométricas no modelo experimental de SHP, sugerindo que o antioxidante é capaz de regular os níveis de ON na síndrome. Nossos resultados demonstram que a Melatonina melhora as alterações gasométricas no modelo de LDB, bem como reverte a vasodilatação intrapulmonar, sugerindo que a Melatonina desempenha um papel semelhante ao da Quercetina na regulação dos níveis de ON na SHP.

Vercelino e colaboradores (4) também encontraram um aumento da lipoperoxidação e atividade antioxidante da enzima SOD no tecido pulmonar no grupo LDB, bem como um

aumento da relação peso pulmonar/peso corporal em animais submetidos a cirurgia de LDB, estando de acordo com nossos resultados. Maarman e colaboradores (11) encontraram um aumento do peso pulmonar e uma diminuição do peso corpóreo no modelo experimental de Hipertensão Pulmonar, o qual foi revertido pelo uso da Melatonina. De maneira similar, em nosso estudo a Melatonina foi capaz de diminuir a relação peso pulmonar/peso corporal.

Encontramos um aumento da lipoperoxidação no grupo LDB e consequente reversão após administrar Melatonina. Uma diminuição na atividade da CAT e um aumento na atividade da GST foram encontrados no grupo LDB, as quais foram revertidas pelo uso da Melatonina. O aumento do estresse oxidativo no organismo e consequente lipoperoxidação, se deve ao desbalanço entre a presença de radicais livres e agentes antioxidantes (22). Embora seja encontrado na literatura resultados diversos sobre a atividade das enzimas antioxidantes CAT e GST, nossos resultados demonstram diminuição na lipoperoxidação e melhora no sistema antioxidante após o uso da Melatonina.

Diversos estudos associam o uso da Melatonina com a diminuição da lipoperoxidação, no entanto, a atividade das enzimas antioxidantes frente ao uso da Melatonina apresentam resultados diversos (11, 12, 23, 24). Maarman e colaboradores (11) encontraram uma diminuição na atividade das enzimas SOD e CAT e da lipoperoxidação no plasma de animais com Hipertensão Pulmonar tratados com Melatonina. Taslidere e colaboradores (12) associam o uso da Melatonina à diminuição da lipoperoxidação e ao aumento da atividade das enzimas CAT e Glutathione (GSH) no tecido pulmonar de ratos após cirrose induzida por Tetracloreto de Carbono (CCl₄). Borges e colaboradores (23) demonstram que o uso da Melatonina diminui a lipoperoxidação muscular gerada pelo exercício vigoroso, bem como aumenta a atividade da SOD, mas não existem alterações significativas na atividade da CAT e da Glutathione Peroxidase (GPx). De maneira similar, Da Rosa e colaboradores (24)

demonstraram que a Melatonina diminui a lipoperoxidação e aumenta a atividade da SOD no fígado de animais submetidos ao modelo experimental de Apneia do Sono.

Nossos resultados obtidos através da análise histológica por picrossirius sugerem que a Melatonina foi capaz de reduzir o acúmulo de colágeno pulmonar (Figura 2). Maarman e colaboradores (11) encontram uma diminuição do colágeno no tecido cardíaco após o uso da Melatonina no modelo de Hipertensão Pulmonar, e Da Rosa e colaboradores (25) constataram uma redução do colágeno hepático após o uso da Melatonina no modelo experimental de cirrose por CCl₄.

A ação antioxidante da Melatonina no tecido hepático e pulmonar está associada com a reversão das principais alterações na SHP. Este efeito terapêutico da Melatonina pode ocorrer por uma melhora direta da atividade antioxidante no pulmão, ou simplesmente pela melhora da condição hepática, revertendo as alterações sistêmicas na doença. O exercício físico também exerce diminuição do estresse oxidativo e aumento da atividade antioxidante de maneira sistêmica. Visto que a cirrose e SHP afetam diferentes órgãos, intervenções terapêuticas que atuem sobre os diferentes sistemas corporais são potencialmente mais indicadas para o manejo da patologia. Portanto, o uso da Melatonina e a prática do exercício físico, associadas às intervenções tradicionais e medicamentosas já bem estabelecidas, podem futuramente auxiliar os pacientes acometidos pela doença.

Conclusão

A ação antioxidante da MEL no tecido pulmonar se mostrou eficaz na redução da vasodilatação, fibrose, estresse oxidativo, assim como na melhora da relação peso pulmonar/peso corporal, PCO₂ e PAO₂ no modelo experimental de SHP. Tais achados sugerem um efeito antioxidante da MEL frente aos danos pulmonares da SHP, sendo eficaz na redução das alterações gasométricas e estruturais ocasionadas pela síndrome.

AGRADECIMENTOS

Nossos sinceros agradecimentos a toda a equipe do Grupo de Pesquisa e Pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), e ao apoio financeiro do Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do HCPA (FIPE-HCPA), assim como ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

REFERÊNCIAS

1. Schuppan, D., & Afdhal, N. H. (2008). Liver cirrhosis. *The Lancet*, 371(9615), 838-851.
2. Zhang, J., & Fallon, M. B. (2012). Hepatopulmonary syndrome: update on pathogenesis and clinical features. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 9(9), 539-549.
3. Grace, J. A., & Angus, P. W. (2013). Hepatopulmonary syndrome: update on recent advances in pathophysiology, investigation, and treatment. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 28(2), 213-219.
4. Vercelino, R., Tieppo, J., Junior, L. A. F., Dias, A. S., Marroni, C. A., & Marroni, N. P. (2008). Modelos experimentais para avaliação das alterações pulmonares na síndrome hepatopulmonar. *J Bras Pneumol*, 34(7), 453-460
5. Zhang, J., Luo, B., Tang, L., Wang, Y., Stockard, C. R., Kadish, I., ...& Fallon, M. B. (2009). Pulmonary angiogenesis in a rat model of hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology*, 136(3), 1070-1080.
6. Yang, W., Zhang, J., Hu, B., Wu, W., Venter, J., Alpini, G., & Fallon, M. B. (2014). The role of receptor tyrosine kinase activation in cholangiocytes and pulmonary vascular endothelium in experimental hepatopulmonary syndrome. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 306(1), G72-G80.
7. Mauriz, J. L., Collado, P. S., Veneroso, C., Reiter, R. J., & González-Gallego, J. (2013). A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *Journal of pineal research*, 54(1), 1-14.
8. Carbajo-Pescador, S., Ordoñez, R., Benet, M., Jover, R., García-Palomo, A., Mauriz, J. L., & González-Gallego, J. (2013). Inhibition of VEGF expression through blockade of

Hif1 α and STAT3 signalling mediates the anti-angiogenic effect of melatonin in HepG2 liver cancer cells. *British journal of cancer*, 109(1), 83-91.

9. Crespo, I., Miguel, B. S., Laliena, A., Álvarez, M., Culebras, J. M., González-Gallego, J., & Tuñón, M. J. (2010). Melatonin prevents the decreased activity of antioxidant enzymes and activates nuclear erythroid 2-related factor 2 signaling in an animal model of fulminant hepatic failure of viral origin. *Journal of pineal research*, 49(2), 193-200

10. Tuñón, M. J., San-Miguel, B., Crespo, I., Laliena, A., Vallejo, D., Álvarez, M., ... & González-Gallego, J. (2013). Melatonin treatment reduces endoplasmic reticulum stress and modulates the unfolded protein response in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin. *Journal of pineal research*, 55(3), 221-228

11. Maarman, G., Blackhurst, D., Thienemann, F., Blauwet, L., Butrous, G., Davies, N., ... & Lecour, S. (2015). Melatonin as a preventive and curative therapy against pulmonary hypertension. *Journal of pineal research*, 59(3), 343-353.

12. Taslidere, E., Esrefoglu, M., Elbe, H., Cetin, A., & Ates, B. (2014). Protective effects of melatonin and quercetin on experimental lung injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Experimental lung research*, 40(2), 59-65.

13. Kountouras, J., Billing, B.H., & Scheuer, P.J. (1984). Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br. J. Exp. Path*, 65, 305-311.

14. Halpern, B. N., & Pacaud, A. (1951). [Technique of obtaining blood samples from small laboratory animals by puncture of ophthalmic plexus.]. *Comptes rendus des seances de La Societe de biologie et de ses filiales*, 145(19-20), 1465-1466.

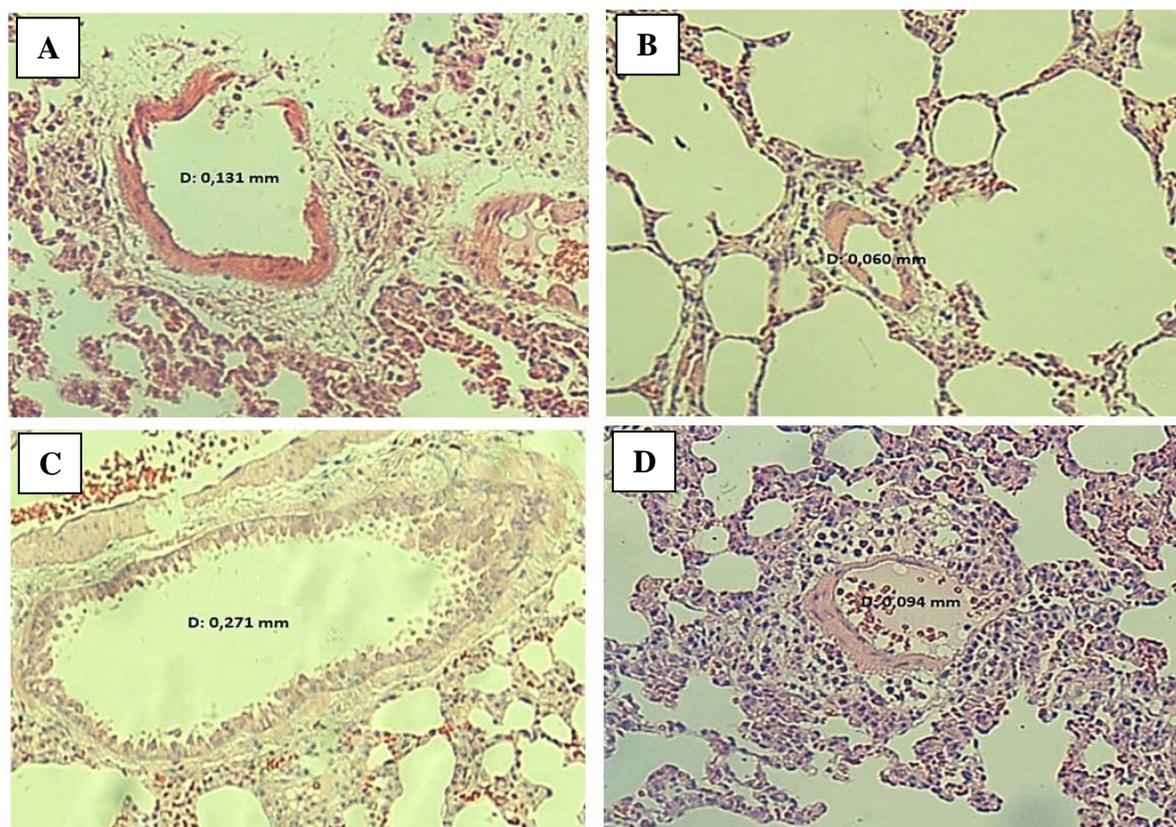
15. Ribeiro-Silva, A., & Silva, G. A. D. (2004). Trocas gasosas intrapulmonares sob respiração em ar ambiente em pacientes hipercapneicos. *Rev. Assoc. Med. Bras.*(1992), 50(1), 32-36.

16. Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, 52, 302-310.
17. Beers, R.F., Sizer, I.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.*, 195:133–140.
18. Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974) The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 249:7130–7139.
19. Rolla, G., Brussino, L., Colagrande, P., Dutto, L., Polizzi, S., Scappaticci, E., Bergerone, S., Morello, M., Marzano, A. (1997). Exhaled nitric oxide and oxygenation abnormalities in hepatic cirrhosis. *Hepatology*, 26: 842–7.
20. Nunes, H., Lebrec, D., Mazmanian, M., Capron, F., Heller, J., Tazi, KA, Zerbib, E., Dulmet, E., Moreau, R. (2001). Role of nitric oxide in hepatopulmonary syndrome in cirrhotic rats. *Am J Respir Crit Care Med*, 164:879–85.
21. Tieppo, J., Cuevas, M. J., Vercelino, R., Tuñón, M. J., Marroni, N. P., & González-Gallego, J. (2009). Quercetin administration ameliorates pulmonary complications of cirrhosis in rats. *The Journal of nutrition*, 139(7), 1339-1346.
22. Sánchez, A., Calpena, A. C., & Clares, B. (2015). Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin. *International journal of molecular sciences*, 16(8), 16981-17004.
23. Borges, L. D. S., Dermargos, A., Junior, E. P. D. S., Weimann, E., Lambertucci, R. H., & Hatanaka, E. (2015). Melatonin decreases muscular oxidative stress and inflammation induced by strenuous exercise and stimulates growth factor synthesis. *Journal of pineal research*, 58(2), 166-172.
24. Da Rosa, D. P., Forgiarini, L. F., e Silva, M. B., Fiori, C. Z., Andrade, C. F., Martinez, D., & Marroni, N. P. (2015). Antioxidants inhibit the inflammatory and apoptotic processes in an intermittent hypoxia model of sleep apnea. *Inflammation Research*, 64(1), 21-29

25. Da Rosa, D. P, Bona, S., Simonetto, D., Zettler, C., Marroni, C. A., & Marroni, N. P. (2010). Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. *Arquivos de gastroenterologia*, 47(1), 72-78.

TABELAS E FIGURAS

Figura 1- Fotos de microscopia das amostras de tecido pulmonar coradas com hematoxilina e eosina (HE), aumento de 50x.



A-Grupo *Sham*; **B-**Grupo *Sham* e Melatonina; **C-**Grupo Ligadura de Ducto Biliar; **D-** Grupo Ligadura de Ducto Biliar e Melatonina.

Tabela 1- Gases sanguíneos, gradiente alvéolo-arterial de oxigênio e a relação peso pulmonar/peso corporal nos quatro grupos experimentais.^a

Variável	Sham	Sham+MEL	LDB	LDB+MEL
PaO ₂	67±11.3	66.3±12.4	57.2±6.2	71±5.4
PaCO ₂	45±1.4	48±5.2	56.6±1.5*	48.2±4.5
SaO ₂	91±4.2	88.3±6.4	84.8±6.2	92.5±2.6
PAO ₂	93.4±1.7	89.7±6.6	78.9±1.9*	89.4±5.7
D (A-a)O ₂	26.4±13	23.4±5.9	21.7±5.7	18.4±11
Relação pesopulmonar/ peso corporal (%)	0,32±0,09	0,34±0,05	0,57±0,05**	0,37±0,02

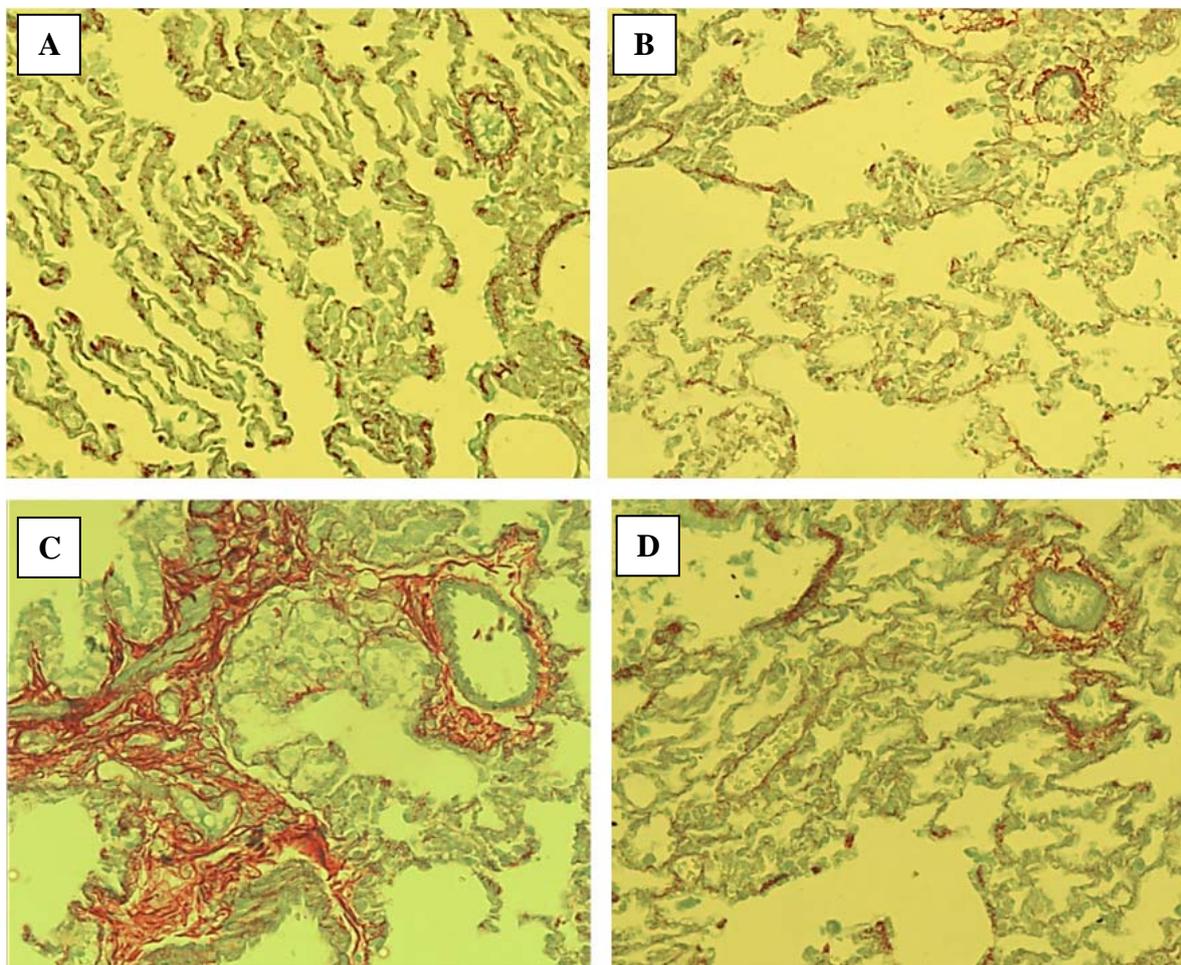
LDB: ligadura de ducto biliar; *Sham*+MEL: *Sham* e melatonina; LDB+MEL: ligadura de ducto biliar e melatonina. PaO₂: pressão parcial arterial de oxigênio; PaCO₂: pressão parcial arterial de gás carbônico; SaO₂: saturação arterial de oxigênio; PAO₂: pressão parcial alveolar de oxigênio; e D (A-a)O₂: gradiente alvéolo-arterial de oxigênio. ^aResultados expressos como média + desvio padrão. *p < 0.05 vs. grupo *Sham*, *Sham*+MEL, LDB+MEL. **p < 0,01 vs. grupo *Sham*, *Sham*+MEL, LDB+MEL.

Tabela 2- Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol/mg proteína), atividade antioxidante da enzima catalase (pmol/min/mg prot.), glutaciona-s-transferase (nmol/min/mg prot.) e relação peso pulmonar/peso corporal (%).^a

Variável	Sham	Sham+MEL	LDB	LDB+MEL
TBARS (nmol/mg proteína)	0.38±0.09	0.37±0.15	0.83±0.13**	0.5±0.08
CAT (pmol/min/mg proteína)	8.32±1.27	9.09±1.01	5.17±0.72**	8.52±1.14
GST (nmol/min/mg proteína)	2.54±1.05	2.08±1.09	7.78±1.22**	3.95±1.99

TBARS: thiobarbituric acid reactive substances (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico); CAT: catalase; GST (glutaciona-s-transferase). LDB: ligadura de ductobiliar; Sham+MEL: Sham e melatonina; LDB+MEL: ligadura de ducto biliar e melatonina. ^aResultados expressos como média + desvio padrão. **p < 0.01 vs. grupo *Sham*, *Sham+MEL*, *LDB+MEL*.

Figura 2- Fotos de microscopia das amostras de tecido pulmonar coradas por picrosirius, aumento de 20X.



A-Grupo *Sham*; **B-**Grupo *Sham* e Melatonina; **C-**Grupo Ligadura de Ducto Biliar; **D-** Grupo Ligadura de Ducto Biliar e Melatonina.

Anexos

Instructions for authors

The *Portuguese Journal of Pulmonology* will consider for publication papers, (original articles or revisions, case reports, letters to the editor, commentaries etc) that are related directly or indirectly with the Respiratory System. The opinions expressed are exclusively the responsibility of the authors. **Articles published will remain the property of the *Portuguese Journal of Pulmonology*, not to be reproduced, wholly or partially, without the permission of the editor.**

All manuscripts are evaluated by members of the editorial board of the journal and acceptance for publication of articles or original research, clinical reports or series of case studies which are accepted, are subject to a technical assessment by the editorial board. In this evaluation process articles may be:

- Accepted without alteration
- Accepted after suggested modifications have been agreed by the authors
- Refused

Only manuscripts containing original material which has not yet been published, wholly or partially (including tables and figures), and which have not been submitted to be published elsewhere, will be considered for publication. Before submitting manuscripts, authors must obtain all necessary authorizations for the publication of the submitted material.

Presentation of manuscripts – Texts should be written in English. Manuscripts submitted to the journal should include the manuscript organized according to the guidelines presented under the Instructions to Authors. Manuscripts should be prepared in Microsoft Word processor or compatible software containing a Title Page, Abstract, Introduction, Methods, Results, Discussion, Reference List, Figure Legends, Tables numbered in Arabic numbers along with the corresponding title. Online submission is available at <http://ees.elsevier.com/rpp>

Please note that the reproduction of images, pictures or graphics from other publications must have prior authorization from the respective authors to comply with norms of the regulations governing the rights of authors. They should be included in the references, by author, as original articles, revisions, letters to the editor or other. All original articles after acceptance will also be published in Portuguese; the authors will be responsible for the translation of the respective articles, to be reviewed by the Editorial Board.

Structure – The usual convention for structure should be employed, in which a new page is used for each separate section of the work, in the following order:

- The first page: Title of work and name/s or author/s with respective academic and/or professional titles, department where the study was carried out, respective contact addresses and e-mails. Where the number of authors exceeds six, this must be justified.
- The next page/s:

- An abstract in English which must not exceed 250 words for original works and 150 for case reports.
 - Key words (3 to 10), which provide the index for the article, according to the terminology of the Medical Index “*Medical Subject Headings*”.
- The text, in the case of original articles, will generally be: Introduction, Material and Methods, Results, Discussion and Conclusions.
 - Acknowledgements
 - References
 - Tables and Figures

Authorship – According to “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals”, authorship implies a substantial contribution to the manuscript. It is therefore necessary in the covering letter to specify the contribution made by each author to the work.

Example: António Costa conceived this study and supervised all aspects of its implementation. José Costa collaborated in the inception of the study and carried out the analysis of the data. Manuel Costa collected the data and collaborated in the analysis. All the authors contributed to the interpretation of the results and the proof reading of the manuscript.

Presentation of work – The whole manuscript, including references, tables and figures, should be formatted in double-spacing, 12 point letter size, and justified on the left. All pages must be numbered, including the title page. Margins in the whole manuscript must be 2.5 cm margins. Page breaks must be inserted between each section. In manuscripts signed by more than 6 authors (3 authors in the case of letters to the editor), there has to be an explicit explanation for such an extensive authorship.

TYPES OF ARTICLES

Articles on original research: The text must not exceed 2000 words, excluding references and tables, and be organized into introduction, methods, results and discussion, with a maximum of 4 tables and/or figures. In the materials and methods there must be a complete and appropriate reference to the statistical methods used and the results should be quite sufficiently explicit.

Review articles: The *Portuguese Journal of Pulmonology* publishes primarily review articles which have been requested by the editors. However, unsolicited articles submitted will be considered, particularly systematic reviews (meta-analysis). The text must not exceed 5000 words, excluding references and tables, with a maximum of 5 tables and/or figures in total. The reviews must be organized systematically in introduction, methods, results and discussion.

Short publications: Preliminary results or new findings could lead to short publications. The text should not exceed 1000

words, excluding references and tables, and be organized into introduction, methods, results and discussion, with a maximum of 2 tables and/or figures in total and up to 10 references. The short publications should be submitted with formal abstracts in Portuguese and English, of not more than 250 words each.

Commentaries: Commentaries, essays, critical analyses or declarations of a position in relation to topics of interest in the area of health, particular the politics of health and medical education will be considered. The text must not exceed 900 words, excluding references and tables, and include a maximum of one table or figure. Commentaries do not require abstracts; they will normally be at the request of the editors.

Special articles: Where appropriate the editorial board may invite one or various authors to write an article on a subject of particular formative interest in achieving the priorities of the journal and where the subject matter is not being addressed by other areas of study (for example postgraduate study).

Clinical case studies (case reports): The text should not exceed 1200 words, excluding references and tables, with a maximum of 2 tables and/or figures in total. Clinical case studies should be submitted with formal abstracts in Portuguese and English, of not more than 120 words each. Depending on their interest and originality the clinical case studies may include a commentary/discussion by one of the editors or by an invited reviewer. (Clinical case study with discussion)

Letters to the editor: Two types of letter to the editor are considered, clinical notes and correspondence.

Clinical notes stand for a very objective reporting of results of clinical observation or original research for which a detailed development is not appropriate. The text should not exceed 700 words, excluding references and tables, and can include a maximum of one table or figure and up to 7 references.

Correspondence refers to a succinct commentaries on articles published in the *Portuguese Journal of Pulmonology*, preferably within the previous 6 months. In this case, the text should not exceed 500 words, excluding references and tables, and can include a maximum of one table or figure and up to 5 references.

Letters to the editor should not include abstracts.

Bibliography – Bibliographical references must be numbered in consecutive order from the first citation in the text. The text must be identified by Arabic numerals. The references must contain, in the case of reviews, the name of the first author (surname and given name), followed by the other authors, the title of the article, the name of the publication and the identification (year, volume and page).

A detailed description of the format of different types of references may be found in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals", of which the following is an example.

Tables and figures - Tables and figures must be presented on separate pages, of high quality, suitable for reproduction, in the order they are discussed in the text. They should be accompanied by their respective titles in a way that they can be understood and interpreted without recourse to the written text. All graphs must be presented in the form of photographs of the respective original. Original photographs

should not be sent nor should illustrations or other materials like X-ray films.

Figures created on computer or in electronic format after digitalization should be enclosed in the manuscript folder. The costs of publication of pictures in colour will be covered by the authors. When manuscripts are accepted pictures will be requested in the most appropriate format for publication in the journal.

Annexes – Very extensive material for publication with the manuscript, particularly extensive tables or tools for data retrieval, may in certain cases, after consideration, be placed on the Internet to be consulted by those interested (**Supplementary Material**).

Ethical considerations and informed consent – The authors must ensure that all research involving human beings has been approved by the ethical commissions within the institutions where the research was carried out, conforming to the Helsinki Declaration of the Association of World Medicine (www.wma.net). In the methods section of the manuscript this approval must be included as well whether, where applicable, informed consent has been obtained. In the submission of clinical reports it is obligatory to include the consent of the patients.

Conflict of Interest - The authors of any manuscript submitted must disclose at the time of submission whether there exists a conflict of interest otherwise make a declaration that there is none. This information will be kept confidential during the consideration of the manuscripts by the external assessors and would not influence the editorial decision but will be published should the article be accepted.

Informed Consent – A statement on obtaining the patient informed consents. If photographs or patient data are reproduced in the article (including names, initials, or hospital numbers of the patients or judicial proceedings numbers), these must not be able to identify the subject. In all cases, the authors must have obtained the written informed consent from the patient (or legal representative, or parent or guardian if the patients are minors), that authorises its publication, reproduction and circulation on paper support and on the internet in *Portuguese Journal of Pulmonology*.

Modifications and revisions - In the case of articles being accepted subject to modifications, changes must be made by the author within fifteen days (for "minor" modifications) or 2 months (for "major" modifications). The proof reading will be the responsibility of the Editorial Board unless the authors indicate otherwise. In the latter case the changes must be made within the time limit set by the Editorial Board, to comply with.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts submitted to the *Portuguese Journal of Pulmonology* must conform to the recommendations indicated above and must be accompanied by a covering letter. The Editorial Board will acknowledge receipt of manuscripts, supplying information as to the orientation category given to the relevant article. Whenever there are editorial recommendations to changes to the manuscripts sent, the authors should supply a new version with an explanation of changes made. Correspondence between the authors and the journal should be conducted electronically, by the Elsevier Editorial System (<http://ees.elsevier.com/rpp>).