

LEÔNCIO LOPES SOARES

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A ESTRUTURA E A FUNÇÃO
CONTRÁTIL DE CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO DIREITO EM RATOS
COM HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR
MONOCROTALINA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S676e
2018

Soares, Leôncio Lopes, 1990-

Efeitos do treinamento físico sobre a estrutura e a função
contrátil de cardiomiócitos do ventrículo direito em ratos com
hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina /
Leôncio Lopes Soares. – Viçosa, MG, 2018.

xiv, 62f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Antônio José Natali.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Exercícios físicos - Aspectos da saúde. 2. Miócitos
cardíacos. 3. Coração - Doenças. 4. Pulmões - Circulação.
5. Esforço físico. 6. Matriz extracelular. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Educação Física. Programa de
Pós-Graduação em Educação Física. II. Título.

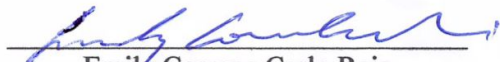
CDD 22. ed. 613.7

LEÔNCIO LOPES SOARES

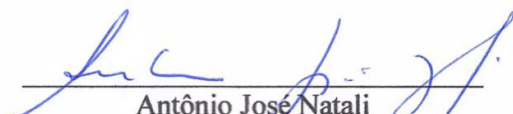
**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A ESTRUTURA E A FUNÇÃO
CONTRÁTIL DE CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO DIREITO EM RATOS
COM HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR
MONOCROTALINA**

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

APROVADA: 16 de julho de 2018.


Emily Correna Carlo Reis
(Coorientadora)


Wellington Lunz


Antônio José Natali
(Orientador)

A Deus por todas as graças alcançadas e mais um ciclo concretizado;
Aos meus pais Sebastião e Aparecida, pelo apoio incondicional;
As minhas irmãs Aline e Andreia por todo apoio, conselhos e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as graças alcançadas, pelo aprendizado adquirido e pelas relações estabelecidas.

Aos meus pais Sebastião e Aparecida e irmãs Aline e Andreia, a base para minhas conquistas, por todo amor, sinceridade, companheirismo.

À minha namorada Eliane pelo amor, paciência, companheirismo e conselhos nessa caminhada acadêmica.

Ao professor Antônio José Natali, orientador, educador e exemplo de profissional. Obrigado pela oportunidade de continuar a estudar, por todos os ensinamentos, confiança, paciência e presença constante e ativa na realização deste trabalho.

Aos meus amigos Filipe Drummond e Meilene Fidélis pela presença e contribuição em todo o processo da construção desse trabalho.

Ao meu amigo e irmão Stéfano Silva por todos os conselhos, ajudas e disponibilidade.

À minha coorientadora, professora Emily Correna Carlo Reis, por toda paciência, disponibilidade e ensinamentos na construção desse trabalho.

Ao professor Clóvis Andrade Neves e à Professora Mariana Machado Neves por todos os ensinamentos e conselhos, bem como disponibilização do laboratório de biologia estrutural para cumprimento de parte deste trabalho.

Aos meus coorientadores professor Thales Nicolau Prímola Gomes, professor Miguel Araújo Carneiro Júnior e amigos do laboratório de Biologia do Exercício (Tiago, Leonardo, Alexandre, Samuel, Victor, Franciane, Anselmo, Aurora, Jean), pelos conselhos, trocas de experiências e momentos de diversão.

Ao laboratório de Biologia do Exercício, minha segunda casa, por toda estrutura para realização deste trabalho.

Ao Departamento de Educação Física com todo seu corpo docente e servidores, em especial aos professores da pós-graduação em Educação Física UFV/UFJF por todo ensinamento nessa caminhada.

Às agências financiadoras CAPES, FAPEMIG e CNPq, que contribuíram e possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos animais experimentais, que merecem todo o respeito.

À UFV, pela oportunidade de realização de mais uma etapa de minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1-Introdução	1
2-Objetivos	4
2.1-Geral	4
2.2-Específicos	4
3-Referências	5
Capítulo 1: Exercise training and pulmonary arterial hypertension: A review of the cardiac Benefits	8
Summary	9
1. Introduction	10
2. Methods	11
2.1. Search strategies	11
2.2. Inclusion and exclusion criteria	12
2.2. Data analysis	12
3. Results	13
3.1. Animal models.....	13
3.2. Exercise training protocols.....	14
3.3. Cardiac functional adaptations	17
3.4. Cardiac structural adaptations	18
4. Discussion.....	20
5. Conclusion.....	23
6. References	24
Capítulo 2: Corrida voluntária beneficia a estrutura e a função contrátil de miócitos do ventrículo direito em ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina ..	29
Resumo.....	30
Abstract	32
1. Introdução.....	34
2. Material e Métodos	35

2.1. Animais e Corrida Voluntária	35
2.2. Indução da Hipertensão Arterial Pulmonar	36
2.3. Teste de tolerância ao esforço físico	36
2.4. Exame ecocardiográfico	37
2.5. Coleta de amostras	37
2.6. Análises histológicas e morfometria do ventrículo direito	37
2.7. Isolamento dos cardiomiócitos	38
2.8. Mensuração da contratilidade celular	39
2.9. Mensuração do Ca^{2+} intracelular transiente	39
2.10. Análise estatística	40
3. Resultados	41
3.1. Sobrevivência	41
3.2. Teste de tolerância ao esforço físico	41
3.3. Hemodinâmica	43
3.4. Peso corporal, peso dos órgãos e suas razões.	45
3.5. Morfometria histológica do ventrículo direito	45
3.6. Contratilidade celular	47
3.7. Ca^{2+} intracelular transiente	48
4. Discussão	50
4.1. Sobrevivência e tolerância ao esforço físico	51
4.2. Hemodinâmica	51
4.3. Morfometria do ventrículo direito e pesos	52
4.4. Contratilidade celular	53
4.5. Ca^{2+} intracelular transiente	54
5. Conclusões	56
6. Referências	57
7. Anexo 1	61
8. Anexo 2	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -MCP – α -miosina de cadeia pesada
 β -MCP – β -miosina de cadeia pesada
 β/α MCP – Razão entre beta e alpha miosina de cadeia pesada
ANOVA – Análise de variância
ATPase – Enzima que catalisa a hidrólise do ATP para produção de energia
c.c.r. – Comprimento celular de repouso
 Ca^{2+} – Íon cálcio
 CaCl_2 – Cloreto de cálcio
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DC – Débito Cardíaco
DMSO – Dimetil-sulfóxido
EC – Exercício Controle
EF – Exercício falha
EGTA – Ácido etilenoglicol tetracético
EM – Exercício Média
eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial
EPM – Erro Padrão da Média
FLB – Fosfolambam
FURA-2AM – Éster Fura-2-acetoximetílico
HAP – Hipertensão Arterial Pulmonar
HEPES – Ácido etanosulfônico-hidroxietil piperazina
HIT – High intensity interval training
HP – Hipertensão pulmonar
Hz – Hertz (frequência)
 K^+ – Íon potássio
KCl – Cloreto de potássio
MCT – Monocrotalina
mg/kg – Razão miligrama por quilograma
 MgCl_2 – Cloreto de magnésio
 MgSO_4 – Sulfato de magnésio
mmHg – milímetros de mercúrio

Na⁺ – Íon sódio
NaCl – Cloreto de sódio
NaF – Fluoreto de sódio
NaH₂PO₄ – Fosfato monossódico
NCX – Canal trocador sódio cálcio
O₂ – Oxigênio
ON – Óxido Nítrico
PAPm – Pressão arterial pulmonar média
PAs – Pequenas artérias pulmonares
PC – Peso corporal
PCP – Pressão capilar pulmonar
PV – Peso dos ventrículos
PVD – Peso do ventrículo direito
PVE – Peso do ventrículo esquerdo
RNA – Ácido ribonucleico
RNAm – RNA mensageiro
rpm – Rotações por minuto
RVP – Resistência vascular pulmonar
RyR₂ – Canais receptores de rianodina do tipo 2
SC – Sedentário controle
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SERCA2a – Isoforma cardíaca da Ca²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático
SF – Sedentário falha
TA – Tempo de aceleração
TA/TE – Razão tempo de aceleração pelo tempo de ejeção
TE – Tempo de Ejeção
TTF – Tempo total de exercício até a fadiga
VD – Ventriculo direito
VE – Ventriculo esquerdo
TAPSE – Tricuspid annular plane systolic excursion

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figure 1. Diagram of the article selection process.....	13
---	----

Capítulo 2

Figura 1. Sobrevida medida nos dias de aparecimento dos sinais de falha cardíaca.	41
--	----

Figura 2. Tolerância ao exercício.....	42
--	----

Figura 3. Dados ecocardiográficos.....	43
--	----

Figura 4. Parâmetros histológicos do ventrículo direito	46
---	----

Figura 5. Contratilidade de cardiomiócitos isolados do ventrículo direito.....	48
--	----

Figura 6. Ca^{2+} intracelular transiente de cardiomiócitos isolados do ventrículo direito.....	50
--	----

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Table 1. Animal models, exercise protocols and main effects on cardiac function and structure.....	15
--	----

Capítulo 2

Tabela 1. Peso corporal, dos órgãos e razões.....	44
---	----

RESUMO

SOARES, Leôncio Lopes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Efeitos do treinamento físico sobre a estrutura e a função contrátil de cardiomiócitos do ventrículo direito em ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina.** Orientador: Antônio José Natali. Coorientadores: Emily Correna Carlo Reis, Miguel Araujo Carneiro Júnior e Thales Nicolau Prímola Gomes.

O objetivo geral desta dissertação foi examinar os efeitos do treinamento físico sobre a estrutura e a função do miocárdio e sobre a função contrátil e o Ca^{2+} intracelular transiente de cardiomiócitos do ventrículo direito em ratos com hipertensão arterial pulmonar (HAP) induzida por monocrotalina (MCT). O primeiro capítulo trata de uma revisão sistemática para examinar as adaptações funcionais e estruturais do coração ao treinamento físico em modelos animais de HAP e destacar os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pelos benefícios do exercício para indivíduos com HAP. Nesta, foram utilizados artigos originais publicados até agosto de 2017, que abordaram o efeito do exercício físico sobre adaptações bioquímicas, mecânicas e moleculares do miocárdio em modelo de HAP. Estes artigos mostraram que o treinamento físico aeróbico e exercício intermitente interferem positivamente na hemodinâmica, função e estrutura do miocárdio que, por sua vez, reduz a deposição de colágeno e fibrose cardíaca, melhora o perfil de proteínas que regulam atividades celulares e a via de respostas inflamatórias que são prejuízos impostos pela HAP melhorando, assim, a tolerância ao exercício e a sobrevida dos animais com HAP. Concluiu-se que treinamento físico aeróbico de intensidade moderada e exercício intermitente contribui para melhora em parâmetros cardiovasculares e para a sobrevida dos animais com HAP. O segundo capítulo trata do experimento para examinar os efeitos do treinamento em corrida voluntária, realizado durante a fase de desenvolvimento da HAP, sobre a estrutura do VD, a contratilidade e o cálcio intracelular transiente (Ca^{2+} intracelular transiente) de miócitos isolados do VD de ratos com HAP induzida por MCT. Neste, ratos Wistar foram divididos em cinco grupos: sedentário controle (SC, n=12); sedentário com falha cardíaca (SF, n=12); exercitado controle (EC, n=8); exercitado com os parâmetros avaliados na média de sobrevida (± 1 dia) dos animais SF para comparação temporal (EM, n=12) e exercitado com falha cardíaca (EF, n=12). Os animais dos grupos EC, EM e EF tiveram livre acesso à roda de corrida voluntária. O grupo EM teve os parâmetros avaliados na média de sobrevivência dos animais SF para comparação temporal. Os animais dos grupos EF, SF e EM receberam uma injeção intraperitoneal (60 mg/kg de peso corporal) de MCT, enquanto os controles (EC e SC) receberam a mesma dose de solução salina. A tolerância ao esforço físico foi calculada

através do tempo total até a fadiga (TTF) e a razão tempo de aceleração e tempo de ejeção (TA/TE) foi calculada através de exame ecocardiográfico. Após manifestação dos sinais da falha cardíaca (SF, EF, EC e SC) parâmetros teciduais e celulares foram avaliados. No grupo EM isto ocorreu no 24º dia após injeção de MCT. Mostrou-se que o treinamento de corrida voluntária retardou o aparecimento dos sinais de falha cardíaca (SF = ~24 dias; EF= ~29 dias, $p<0,05$), aumentou a tolerância ao exercício (21º dia pós-MCT: EC = $35,99 \pm 3,61$ min; EF = $35,90 \pm 5,14$ min; EM = $39,79 \pm 5,14$ min; SF = $19,34 \pm 1,24$ min; $p<0,05$. 27º dia pós-MCT: EC = $36,51 \pm 1,96$ min; SF = $14,89 \pm 1,84$ min; $26,19 \pm 5,11$ min; $p<0,05$.) e retardou os prejuízos no TA/TE (22º dia pós-MCT: SC = $0,52 \pm 0,02$; EC = $0,52 \pm 0,01$; SF = $0,38 \pm 0,03$; EF = $0,38 \pm 0,03$; $p<0,05$. 24ª dia pós-MCT: SC = $0,46 \pm 0,01$; EC = $0,52 \pm 0,02$; SF = $0,35 \pm 0,02$; EF = $0,36 \pm 0,02$; EM (23º dia) = $0,44 \pm 0,02$, $p < 0,05$). Em nível tecidual, o exercício retardou os prejuízos nos percentuais de cardiomiocitos (SC = $89,43 \pm 1,06$ %; EM = $88,81 \pm 1,06$ %; EF = $82,30 \pm 1,01$ %; SF = $75,39 \pm 1,16$ %; $p < 0,05$) e de matriz extracelular (SC = $10,57 \pm 1,06$ %; EM = $11,19 \pm 0,58$ %; EF = $17,70 \pm 1,02$ %; SF = $24,61 \pm 1,16$ %; $p < 0,05$) reduzido pela HAP. Em nível celular, o exercício retardou os prejuízos impostos pela HAP nos parâmetros de contratilidade (aumentou a amplitude e reduziu os tempos para o pico de contração e para 50% de relaxamento) e de Ca^{2+} intracelular transiente (aumentou a amplitude e reduziu os tempos para o pico e para 50% de decaimento) de cardiomiocitos do VD (EM vs. EF e SF, $p < 0,05$). Concluiu-se que o exercício voluntário é capaz de promover benefícios à estrutura tecidual do VD e à função contrátil de cardiomiocitos isolados do VD em ratos com HAP induzida por MCT. Estas melhoras indicam contribuição positiva do exercício físico voluntário na tolerância ao esforço físico e para retardar o desenvolvimento da falha cardíaca nestes animais.

ABSTRACT

SOARES, Leôncio Lopes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Effects of physical training on the structure and contractile function of right ventricular cardiomyocytes in rats with monochrotalin-induced pulmonary arterial hypertension.** Adviser: Antônio José Natali. Co-advisers: Emily Correna Carlo Reis, Miguel Araujo Carneiro Júnior and Thales Nicolau Prímola Gomes.

The general objective of this dissertation was to examine the effects of physical training on myocardial structure and function and on the contractile function and transient intracellular calcium of cardiomyocytes isolated from the right ventricle (RV) of rats with pulmonary arterial hypertension (PAH) induced by monocrotaline (MCT). The first chapter addresses a systematic review to examine the functional and structural adaptations of the heart to physical training in animal models of PAH and to highlight the cellular and molecular mechanisms responsible for the benefits of exercise for individuals with PAH. In this review, were used original articles published until August 2017, which addressed the effect of physical exercise on biochemical, mechanical and molecular adaptations of the myocardium in the PAH model. These articles have shown that aerobic physical training and intermittent exercise positively interfere with myocardial hemodynamics, function and structure, which in turn reduces collagen deposition and cardiac fibrosis, improves the profile of proteins that regulate cellular activities and the pathway of inflammatory responses that are damages caused by PAH, thus improving tolerance to exercise and survival of animals with PAH. It was concluded that aerobic physical training of moderate intensity and intermittent exercise contributes to an improvement in cardiovascular parameters and to the survival of the animals. The second chapter deals with the experiment to examine the effects of training in voluntary running during the developmental phase of PAH on RV structure, contractility, and transient intracellular calcium (Ca^{2+}) of myocytes isolated from the RV of rats with MCT-induced PAH. In this trial, Wistar rats were divided into five groups: sedentary control (SC, n = 12); sedentary heart failure (SF, = 12); exercised control (EC, n = 12); exercised with the parameters evaluated in the mean survival (± 1 day) of SF animals for temporal comparison (AE, n = 12) and exercised with heart failure (EF, n = 12). Animals from the EC, AE and EF groups had free access to the voluntary running wheel. The AE group had the parameters evaluated in the mean survival of SF animals for temporal comparison. Animals of the EF, SF and AE groups received an intraperitoneal injection (60 mg/kg body weight) of MCT, while controls (EC and SC) received the same dose of saline solution. Physical effort tolerance was measured through the total exercise time until fatigue (TTF) and the ratio of acceleration time

and ejection time (AT/ET) by echocardiographic examination. After manifestation of the signs of heart failure (SF, EF, EC and SC) tissue and cellular parameters were evaluated. In the AE group this occurred on the 24th day after injection of MCT. Voluntary physical exercise was shown to delay the onset of signs of cardiac failure (SF = ~ 24 days; EF = ~ 29 days, $p < 0.05$), increased exercise tolerance (21st day after MCT: EC = 35.99 ± 3.61 min; EF = 35.90 ± 5.14 min; AE = 39.79 ± 5.14 min; SF = 19.34 ± 1.24 min; $p < 0.05$. 27th day after MCT: EC = 36.51 ± 1.96 min; SF = 14.89 ± 1.84 min; SC 26.19 ± 5.11 min; $p < 0.05$), and delayed the reduction in AT/TE (22nd day after MCT: SC = 0.52 ± 0.02 ; EC = 0.52 ± 0.01 ; SF = 0.38 ± 0.03 ; EF = 0.38 ± 0.03 ; $p < 0.05$. 24th day after MCT: SC = 0.46 ± 0.01 ; EC = 0.52 ± 0.02 ; SF = 0.35 ± 0.02 EF = 0.36 ± 0.02 ; AE (23nd day) = 0.44 ± 0.02 $p < 0.05$). At the tissue level, exercise delayed the losses in the percentages of cardiomyocytes (SC = 89.43 ± 1.06 %, AE = 88.81 ± 1.06 %, EF = 82.30 ± 1.01 %, SF = 75.39 ± 1.16 %, $p < 0.05$) and extracellular matrix (SC = 10.57 ± 1.06 %; AE = 11.19 ± 0.58 %; EF = 17.70 ± 1.02 %; SF = 24.61 ± 1.16 %; $p < 0.05$) reduced by PAH. At the cellular level, exercise delayed HAP impairment in contractility parameters (increased the amplitude and reduced the time for peak and for 50% relaxation) and transient intracellular Ca^{2+} (raised the amplitude and decreased the time for peak and for 50% of decay) in cardiomyocytes of the RV (AE vs. EF e SF, $p < 0.05$). It was concluded that voluntary exercise is capable of promoting benefits to the RV tissue structure and the contractile function of cardiomyocytes isolated from RV in rats with MCT-induced PAH. These improvements indicate a positive contribution of voluntary physical exercise to tolerance of physical effort and to delay the development of heart failure in these animals.

1-INTRODUÇÃO

A hipertensão pulmonar (HP) é uma doença de rápida progressão que afeta mais de 25 milhões de indivíduos em todo o mundo e, na maioria das vezes, é fatal (1). A HP foi previamente classificada como primária ou secundária, conforme ausência ou presença de um agente causal ou fatores de risco identificados (2). Atualmente, uma classificação clínica é estabelecida para individualizar diferentes categorias de HP de acordo com achados patológicos, características hemodinâmicas e tratamentos semelhantes. Esta classificação relaciona-se com as cinco principais etiologias, incluindo doenças cardíacas esquerdas, doenças respiratórias e/ou hipóxia, doença tromboembólica crônica, mecanismos multifatoriais pouco claros e hipertensão arterial pulmonar (HAP) (3).

A hipertensão arterial pulmonar, o subtipo mais frequente da HP, é uma doença progressiva do sistema vascular pulmonar. Definida como vasculopatia pulmonar, essa é caracterizada por pressão arterial pulmonar média em repouso (PAPm) acima de 25 mmHg e pressão capilar pulmonar menor que 15 mmHg (4). É causada pelo fluxo sanguíneo restrito na circulação arterial pulmonar, a combinação de disfunção endotelial e aumento da contratilidade das pequenas artérias pulmonares (PAs). Isto ocorre devido à proliferação e remodelação das células musculares lisas endoteliais, trombose *in situ*, resistência à apoptose, inflamação e fibrose mediada por um dramático remodelamento da matriz extracelular das artérias e arteríolas pulmonares, que resulta em aumento da resistência vascular pulmonar (RVP) e, em última instância, na falha cardíaca (4-6).

O aumento crônico da RVP leva a um aumento na pós-carga do ventrículo direito (VD). Essa sobrecarga gera uma resposta adaptativa ou remodelamento adverso do VD, que resulta em hipertrofia associada a aumento da tensão passiva dos sarcômeros, deposição de colágeno na matriz extracelular e fibrose no miocárdio, inflamação e apoptose celular e, conseqüentemente, disfunção contrátil (6). Este quadro conduz à insuficiência ventricular direita à medida que os danos estruturais e funcionais progridem (7). A Falha cardíaca é a maior causa de morte entre os pacientes com HAP (8, 9).

Os sintomas da HAP, como falta de ar com esforço físico, fadiga, letargia, retenção de líquidos, edema nos membros inferiores e pré-síncope/síncope estão quase todos relacionados a um declínio progressivo da função cardíaca direita. Além disso, ineficiência ventilatória e perda de massa muscular associada à reduzida capilarização muscular contribuem para uma pior oxigenação, intolerância ao esforço físico e conseqüente declínio da qualidade de vida dos pacientes (10). Essas características surgem por causa do aumento progressivo da RVP e

da consequente sobrecarga crônica do VD ao ponto que esse começa a se dilatar e a falhar, uma vez que esse se torna incapaz de atender à demanda crescente da pós-carga (4, 5).

O uso de modelos animais para o estudo da HAP (hipóxia crônica; lesão por monocrotalina [MCT]; MCT e pneumonectomia; Sugen 5416 e hipóxia e camundongos *knockout*) tem sido usados para a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patologia da doença, assim como para a descoberta de alvos terapêuticos. Um dos modelos mais utilizados é HAP induzida por MCT. Esse modelo têm como características: aumentos da migração e proliferação de células musculares lisas da circulação pulmonar, hipertrofia de vasos e espessamento das artérias pulmonares proximais e adventícia, fibrose e enrijecimento arterial. Além disso, a lesão por MCT, promove inflamação da adventícia, particularmente o acúmulo de macrófagos, danos hepáticos e renais significativos e, consequentemente, doença veno-oclusiva hepática, hipertrofia e disfunção significativa do VD, o que é imprescindível para entendimentos dos mecanismos envolvidos na HP (11, 12).

Em nível celular, vários mecanismos contribuem para o remodelamento patológico do VD sobrecarregado por pressão, incluindo aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio, ativação das vias apoptóticas e ativação neuro-hormonal (ex. vias adrenérgicas) (13). Além disso, assim como no ventrículo esquerdo (VE) com sobrecarga de pressão, aumento na razão das miosinas de cadeia pesada alfa e beta (β/α MCP), proliferação celular, inflamação e apoptose são evidenciados no VD de modelos com HAP (14). Estudos em animais e humanos sustentam um papel da inflamação no ventrículo direito com sobrecarga de pressão, demonstrando que os neutrófilos e macrófagos podem estar envolvidos no remodelamento do VD durante a HAP (14, 15).

Os cardiomiócitos do VD em modelos de HAP comumente apresentam anormalidades no acoplamento excitação-contração (16, 17), sendo a relação contração-frequência apresenta-se negativa (18), o que está associada a uma queda na amplitude do cálcio (Ca^{2+}) intracelular transiente (19, 20). Na falha cardíaca direita induzida por HAP, a regulação alterada do ciclo intracelular de Ca^{2+} contribui para que a movimentação do Ca^{2+} intracelular transiente frequentemente seja menor e mais lento, o que conduz à disfunção contrátil e à redução da capacidade de responder a demandas contráteis (21). Essas alterações no acoplamento excitação-contração presentes na HAP, por sua vez, estão associadas a distúrbios na expressão e atividade de proteínas reguladoras do Ca^{2+} , como fosfolambana (FLB), SERCA2a (Ca^{2+}

ATPase do RS), receptor de rianodina tipo 2 (RyR2) e canal trocador de sódio cálcio (NCX) (16, 17).

Devido às características clínicas e ao prognóstico da doença, os tratamentos da HAP tem evoluído consideravelmente ao longo da última década em consequência, em parte, aos avanços no conhecimento da patobiologia da doença em humanos e em modelos animais. Esses tratamentos têm como objetivo, dado os graves distúrbios hemodinâmicos causados pela HAP, reduzir a pressão arterial pulmonar e normalizar o débito cardíaco (DC). Outro objetivo importante é reverter, ou pelo menos prevenir, a progressão da doença a fim de aumentar a sobrevida dos pacientes com HAP (9).

O exercício físico tem sido reconhecido e recomendado como ferramenta terapêutica não farmacológica em várias doenças, dentre elas as pulmonares (ex. doença pulmonar obstrutiva crônica, asma e fibrose cística) e as doenças cardiovasculares (ex. hipertensão, doença coronariana e falha cardíaca) (22). Embora o conhecimento acerca dos benefícios do exercício físico sobre o sistema cardiovascular esteja bem estabelecido, continua a ser testado se o exercício físico regular pode atenuar ou reverter as complicações impostas pela HAP. Apesar das limitações impostas pela HAP, crescem as evidências em humanos (23-28) e em modelos animais (18, 29-32) de que o exercício físico pode promover efeitos benéficos aos indivíduos com HAP. Os resultados positivos globais observados nos estudos com humanos são traduzidos por: melhora na qualidade de vida e capacidade funcional, aumento da capacidade de exercício e da eficiência ventilatória, melhora da função cardíaca global, elasticidade arterial e do miocárdio, metabolismo muscular, combate ao estresse oxidativo, ao processo inflamatório e ao remodelamento cardiopulmonar adverso presente (18, 29-34)

Modelos animais de HAP, principalmente a induzida por MCT, têm sido utilizados também para o estudo dos efeitos do exercício físico sobre a estrutura e a função do miocárdio. Recentes revisões (35, 36) apresentaram que o treinamento físico aeróbico de intensidades baixa e moderada e o exercício intermitente, inclusive a corrida voluntária em roda, contribuem para melhora da estrutura e da hemodinâmica cardíaca. Em nível celular, esses tipos de exercício contribuem para reduzir a deposição de colágeno e a fibrose no miocárdio direito, para a melhora da contratilidade de cardiomiócitos e do perfil de proteínas que regulam atividades celulares, para preservar e/ou diminuir a relação β/α MCP e para a melhora das respostas inflamatórias que são impostas pela HAP. Apesar dos avanços no conhecimento neste tema, os efeitos de exercício físico sobre o acoplamento excitação-contracção e sobre as alterações na regulação do Ca^{2+} intracelular que impactam a estabilidade

funcional do VD na falha cardíaca ainda não são completamente conhecidos em modelo de HAP induzida por MCT. Tal conhecimento é importante para o melhor entendimento sobre as contribuições do exercício físico para a saúde do miocárdio de pacientes com HAP.

2-OBJETIVOS

2.1-Geral

O objetivo deste estudo foi examinar os efeitos do treinamento físico sobre a estrutura e a função do miocárdio e sobre a função contrátil e o Ca^{2+} intracelular transiente de cardiomiócitos do ventrículo direito em ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina.

2.2-Específicos

2.2.1. Revisar a literatura referente às adaptações cardíacas funcionais e estruturais ao treinamento físico em modelos animais de HAP, e destacar os mecanismos celulares e moleculares que expliquem os benefícios do exercício aos indivíduos com HAP.

2.2.2. Verificar se o exercício de corrida voluntária realizado durante o desenvolvimento da HAP induzida por MCT em ratos afeta:

- a) A sobrevivência;
- b) A tolerância ao esforço físico;
- c) A hemodinâmica da artéria pulmonar;
- d) A morfometria tecidual do VD;
- e) A contratilidade e o Ca^{2+} intracelular transiente em cardiomiócitos isolados do VD.

Para tal, foram realizados dois estudos. Para atingir o objetivo 2.2.1, realizou-se uma revisão sistemática da literatura atual. Para atingir o objetivo 2.2.2, realizou-se um estudo experimental.

3. Referências

1. Elliott CG, Barst RJ, Seeger W, Porres-Aguilar M, Brown LM, Zamanian RT, et al. Worldwide physician education and training in pulmonary hypertension: pulmonary vascular disease: the global perspective. *Chest*. 2010 Jun;137(6 Suppl):85S-94S. PubMed PMID: 20522584. Epub 2010/06/11. eng.
2. Hypertension WHOMoPP, Hatano S, Strasser T, editors. Primary pulmonary hypertension : report on a WHO meeting, Geneva, 15-17 October 19731975; Geneva; [Albany, N.Y.]: World Health Organization ; [Distributed by Q Corp.].
3. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, et al. Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013 2013/12/24;62(25, Supplement):D34-D41.
4. Ryan JJ, Archer SL. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circ Res*. 2014 Jun 20;115(1):176-88. PubMed PMID: 24951766. Pubmed Central PMCID: PMC4112290. Epub 2014/06/22. eng.
5. Lai YC, Potoka KC, Champion HC, Mora AL, Gladwin MT. Pulmonary arterial hypertension: the clinical syndrome. *Circ Res*. 2014 Jun 20;115(1):115-30. PubMed PMID: 24951762. Pubmed Central PMCID: PMC4096686. Epub 2014/06/22. eng.
6. Ryan JJ, Huston J, Kutty S, Hatton ND, Bowman L, Tian L, et al. Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension. *The Canadian journal of cardiology*. 2015 Apr;31(4):391-406. PubMed PMID: 25840092. Pubmed Central PMCID: PMC4385216. Epub 2015/04/04. eng.
7. Voelkel NF, Quaife RA, Leinwand LA, Barst RJ, McGoon MD, Meldrum DR, et al. Right ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. *Circulation*. 2006 Oct 24;114(17):1883-91. PubMed PMID: 17060398. Epub 2006/10/25. eng.
8. Colvin KL, Yeager ME. Animal Models of Pulmonary Hypertension: Matching Disease Mechanisms to Etiology of the Human Disease. *Journal of pulmonary & respiratory medicine*. 2014;4(4):198. PubMed PMID: PMC4334132.
9. McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, Barst RJ, Farber HW, Lindner JR, et al. ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association: developed in collaboration with the American College of Chest Physicians, American Thoracic Society, Inc., and the Pulmonary Hypertension Association. *Circulation*. 2009 Apr 28;119(16):2250-94. PubMed PMID: 19332472. Epub 2009/04/01. eng.
10. Malenfant S, Potus F, Mainguy V, Leblanc E, Malenfant M, Ribeiro F, et al. Impaired Skeletal Muscle Oxygenation and Exercise Tolerance in Pulmonary Hypertension. *Medicine and science in sports and exercise*. 2015 Nov;47(11):2273-82. PubMed PMID: 25970662. Epub 2015/05/15. eng.
11. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2009 2009/12/01;297(6):L1013-L32.
12. Sztuka K, Jasinska-Stroschein M. Animal models of pulmonary arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis of data from 6126 animals. *Pharmacol Res*. 2017 Nov;125(Pt B):201-14. PubMed PMID: 28867639. Epub 2017/09/05. eng.
13. Vonk-Noordegraaf A, Haddad F, Chin KM, Forfia PR, Kawut SM, Lumens J, et al. Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology. *J*

- Am Coll Cardiol. 2013 Dec 24;62(25 Suppl):D22-33. PubMed PMID: 24355638. Epub 2013/12/21. eng.
14. Wrigley BJ, Lip GY, Shantsila E. The role of monocytes and inflammation in the pathophysiology of heart failure. *European journal of heart failure*. 2011 Nov;13(11):1161-71. PubMed PMID: 21952932. Epub 2011/09/29. eng.
 15. von Haehling S, von Bardeleben RS, Kramm T, Thiermann Y, Niethammer M, Doehner W, et al. Inflammation in right ventricular dysfunction due to thromboembolic pulmonary hypertension. *Int J Cardiol*. 2010 Oct 8;144(2):206-11. PubMed PMID: 19411119. Epub 2009/05/05. eng.
 16. Kusakari Y, Urashima T, Shimura D, Amemiya E, Miyasaka G, Yokota S, et al. Impairment of Excitation-Contraction Coupling in Right Ventricular Hypertrophied Muscle with Fibrosis Induced by Pulmonary Artery Banding. *PLoS ONE*. 2017 01/0905/31/received 11/28/accepted;12(1):e0169564. PubMed PMID: PMC5222608.
 17. Fowler ED, Benoist D, Drinkhill MJ, Stones R, Helmes M, Wüst RCI, et al. Decreased creatine kinase is linked to diastolic dysfunction in rats with right heart failure induced by pulmonary artery hypertension. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015;86:1-8.
 18. Natali AJ, Fowler ED, Calaghan SC, White E. Voluntary exercise delays heart failure onset in rats with pulmonary artery hypertension. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2015 Aug 1;309(3):H421-4. PubMed PMID: 26001413. Epub 2015/05/24. eng.
 19. Benoist D, Stones R, Drinkhill MJ, Benson AP, Yang Z, Cassan C, et al. Cardiac arrhythmia mechanisms in rats with heart failure induced by pulmonary hypertension. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012 Jun 1;302(11):H2381-95. PubMed PMID: 22427523. Pubmed Central PMCID: PMC3378302. Epub 2012/03/20. eng.
 20. Fowler ED, Benoist D, Drinkhill MJ, Stones R, Helmes M, Wust RC, et al. Decreased creatine kinase is linked to diastolic dysfunction in rats with right heart failure induced by pulmonary artery hypertension. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 Sep;86:1-8. PubMed PMID: 26116865. Pubmed Central PMCID: PMC4564291. Epub 2015/06/28. eng.
 21. Fowler ED, Drinkhill MJ, Norman R, Pervolaraki E, Stones R, Steer E, et al. Beta1-adrenoceptor antagonist, metoprolol attenuates cardiac myocyte Ca(2+) handling dysfunction in rats with pulmonary artery hypertension. *J Mol Cell Cardiol*. 2018 Jul;120:74-83. PubMed PMID: 29807024. Epub 2018/05/29. eng.
 22. Pedersen BK, Saltin B. Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2015 Dec;25 Suppl 3:1-72. PubMed PMID: 26606383. Epub 2015/11/26. eng.
 23. Troosters T, Casaburi R, Gosselink R, Decramer M. Pulmonary rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(1):19-38.
 24. Piepoli MF, Davos C, Francis DP, Coats AJ. Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH). *BMJ*. 2004 Jan 24;328(7433):189. PubMed PMID: 14729656. Pubmed Central PMCID: PMC318480. Epub 2004/01/20. eng.
 25. Mereles D, Ehlken N, Kreuscher S, Ghofrani S, Hoeper MM, Halank M, et al. Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Circulation*. 2006 Oct 3;114(14):1482-9. PubMed PMID: 16982941. Epub 2006/09/20. eng.
 26. Weinstein AA, Chin LM, Keyser RE, Kennedy M, Nathan SD, Woolstenhulme JG, et al. Effect of aerobic exercise training on fatigue and physical activity in patients with pulmonary arterial hypertension. *Respir Med*. 2013;107(5):778-84.

27. Yuan P, Yuan XT, Sun XY, Pudasaini B, Liu JM, Hu QH. Exercise training for pulmonary hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2015 Jan 15;178:142-6. PubMed PMID: 25464238. Epub 2014/12/03. eng.
28. Arena R, Cahalin LP, Borghi-Silva A, Myers J. The effect of exercise training on the pulmonary arterial system in patients with pulmonary hypertension. *Progress in cardiovascular diseases.* 2015 Mar-Apr;57(5):480-8. PubMed PMID: 25782656. Epub 2015/03/19. eng.
29. Souza-Rabbo MP, Silva LF, Auzani JA, Picoral M, Khaper N, Bello-Klein A. Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008 Aug;35(8):944-8. PubMed PMID: 18430062. Epub 2008/04/24. eng.
30. Handoko ML, de Man FS, Happe CM, Schaliij I, Musters RJ, Westerhof N, et al. Opposite effects of training in rats with stable and progressive pulmonary hypertension. *Circulation.* 2009;120(1):42-9.
31. Moreira-Goncalves D, Ferreira R, Fonseca H, Padrao AI, Moreno N, Silva AF, et al. Cardioprotective effects of early and late aerobic exercise training in experimental pulmonary arterial hypertension. *Basic Res Cardiol.* 2015 Nov;110(6):57. PubMed PMID: 26463598. Epub 2015/10/16. eng.
32. Brown MB, Neves E, Long G, Graber J, Gladish B, Wiseman A, et al. High-intensity interval training, but not continuous training, reverses right ventricular hypertrophy and dysfunction in a rat model of pulmonary hypertension. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology.* 2017 Feb 1;312(2):R197-R210. PubMed PMID: 27784688. Pubmed Central PMCID: PMC5504398. Epub 2016/10/28. eng.
33. Buys R, Avila A, Cornelissen VA. Exercise training improves physical fitness in patients with pulmonary arterial hypertension: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. *BMC Pulm Med.* 2015 Apr 22;15:40. PubMed PMID: 25896259. Pubmed Central PMCID: PMC4423624. Epub 2015/04/22. eng.
34. Shoemaker MJ, Wilt JL, Dasgupta R, Oudiz RJ. Exercise Training in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension: A Case Report. *Cardiopulmonary Physical Therapy Journal.* 2009;20(4):12-8. PubMed PMID: 01823246-200920040-00003.
35. Soares LL, Drummond FR, Lavorato VN, Carneiro-Junior MA, Natali AJ. Exercise training and pulmonary arterial hypertension: A review of the cardiac benefits. *Science & Sports.* 2018 2018/04/17/.
36. Nogueira-Ferreira R, Moreira-Gonçalves D, Santos M, Trindade F, Ferreira R, Henriques-Coelho T. Mechanisms underlying the impact of exercise training in pulmonary arterial hypertension. *Respiratory Medicine.* 2018 2018/01/01/;134:70-8.

Capítulo 1: Exercise training and pulmonary arterial hypertension: A review of the cardiac benefits

Leôncio L. Soares^a, Filipe R. Drummond^b, Victor N. Lavorato^c, Miguel A. Carneiro-Junior^a, Antônio J. Natali^{a,*}

^a Laboratory of Exercise Biology, Department of Physical Education, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil;

^b Department of General Biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil;

^c Department of Biological Sciences, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil.

Keywords: physical activity, cardiac remodeling, pulmonary circulation, heart diseases

***Corresponding author:** Dr. Antônio J. Natali, PhD, Department of Physical Education, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa-MG, Brasil, Fax/phone number: + 55 31 38992249 (ajnatali@ufv.br).

Summary

Aims: - Patients of pulmonary arterial hypertension (PAH) exhibit reduced functional capacity and exercise tolerance. Despite the evidences that exercise training is beneficial to this population, it is still being tested whether regular physical exercise can mitigate the complications of PAH. The aim of this review was to point out the cardiac functional and structural adaptations to exercise training in animal models of PAH, and highlight the cellular and molecular mechanisms underlying the benefits of exercise to individuals with PAH.

News: - A systematic review of original articles published in PubMed and ScienceDirect databases was conducted by two independent researchers. Relevant information on animal model, exercise protocol, cardiac functional and structural adaptations was extracted and discussed. The results show that in rats with monocrotaline-induced PAH (50 – 60 mg/kg body weight), the predominant model used, aerobic continuous (treadmill running) and intermittent (voluntary wheel running) exercise training of moderate intensity, performed either prior or during the development of PAH, promote benefits to the myocardium. Moreover, the articles reveal that the cardiac function (i.e. restoration of right ventricle systolic and diastolic pressure, AT/ET ratio, TAPSE and cardiomyocyte contractility) and structure (i.e. reduced hypertrophy and fibrosis; improved profile of proteins related to cellular contraction and inflammatory response) are enhanced by exercise training. Furthermore, these exercise adaptations result in augmented exercise capacity and survival of animals with PAH.

Conclusion: - Regular aerobic exercise of moderate intensity promotes cellular and molecular adaptations that improve myocardial function and structure along with increased exercise tolerance and survival.

KEY WORDS: Physical activity; Cardiac remodeling; Pulmonary circulation; Heart diseases

1. Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a syndrome caused by restricted blood flow in the pulmonary arterial circulation, resulting in augmented pulmonary vascular resistance, which chronically leads to heart failure [1]. The predominant cause of increased pulmonary vascular resistance is the reduction of vascular luminal cross section due to the adverse remodeling produced by excessive cell proliferation and reduced rates of apoptosis in the arteries and arterioles of the pulmonary circulation [2].

The chronic increase in pulmonary vascular resistance leads to a surge in the right ventricle (RV) afterload [3]. Such overload generates an adverse remodeling of the RV, resulting in hypertrophy associated with increased sarcomeric passive tension (i.e. reduced titin phosphorylation), fibrosis (i.e. increased collagen deposition in the extracellular matrix) and cellular apoptosis leading to a progressive contractile dysfunction [4]. A compensatory RV chamber dilatation allows an enhanced preload which maintains the volume of blood flow, despite the reduced fraction of shortening. As structural and functional damages progress, RV failure is established. Such insufficiency is characterized by increased filling pressures, diastolic dysfunction and diminishing cardiac output associated with tricuspid regurgitation due to annular dilatation and weak leaflet coaptation [2]. Heart failure is the leading cause of death among patients with PAH [5, 6].

Pulmonary arterial hypertension has a poor prognosis, which is evidenced by survival rates that can be less than 3 years in the absence of treatment [7]. At the moment, the survival prognosis for patients with PAH has been determined by the functionality of the RV, and while it maintains its function, the patients remain with few symptoms [3]. Thus, the knowledge of new strategies that contributes to the improvement or maintenance of cardiac function along with the attenuation of the disease progression is paramount for this field of science.

The treatments for PAH have evolved considerably over the last decade due, in part, to advances in the knowledge of the pathobiology of the disease. These treatments aim, given the severe hemodynamic disturbances caused by PAH, to reduce pulmonary arterial pressure and normalize cardiac output. Another important goal is to reverse, or at least prevent, the progression of the disease in order to raise the survival of patients with PAH [1].

Physical exercise has been recognized as a non-pharmacological therapeutic tool in several chronic diseases. However, it is still being tested whether regular physical exercise can mitigate or reverse the complications of PAH. Cellular changes along with augmented

oxidative stress and changes in hemodynamic variables reduce functional capacity and exercise tolerance due to lower cardiac output. Despite these limitations imposed by PAH, there is a growing body of evidences in humans [8-14] and in animal models [15-18] that exercise training may promote beneficial effects on individuals with PAH, although there is no consensus on the exercise type, intensity and duration of exercise. The overall positive results observed in human studies are translated into: improvement in quality of life and functional capacity, increase in exercise capacity and ventilatory efficiency, improvement of global cardiac function, arterial and myocardial elasticity, muscle metabolism, in opposition to the oxidative stress, inflammatory process and adverse cardiopulmonary remodeling present [15-17, 19-21].

The use of animal models of PAH has contributed to the understanding of the cellular and molecular mechanisms involved in the pathology of the disease, as well as to the discovery of therapeutic targets. In these models, different degrees of remodeling of the pulmonary artery and arterioles (e.g. thickening of the intima by increased proliferation and migration of local satellite cells, hypertrophy of the media and adventitia cells, accumulation of fibroblasts in the adventitia, enlarged vessel wall thickness and arterial stiffness) are found which results in a surge in pulmonary arterial pressure with consequent RV remodeling and dysfunction [22, 23]. Hence, these models have also been used to study the effects of exercise training on cardiac function and structure. Therefore, the aim of this review was to point out the cardiac functional and structural adaptations to exercise training in animal models of PAH, and highlight the cellular and molecular mechanisms underlying the benefits of exercise to individuals with PAH.

2. Methods

2.1. Search strategies

In this study, we carried out a systematic review of the original articles published until September 2017 that addressed the effect of exercise training on biochemical, mechanical and molecular adaptations of the myocardium in the PAH model. In this review were followed the criteria established by the Prism system (Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analysis), designed to guide such studies [24, 25].

The search was conducted in the PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) and ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com/>) databases using, either isolated or combined, the following descriptors: pulmonary arterial hypertension; physical exercise; heart;

cardiomyocytes and rats. We used original studies published in full that had fit the established inclusion criteria.

The selected articles were evaluated and classified according to the methodological criteria proposed by Jadad and colleagues [26], which qualifies the studies on a scale of points from 1 to 5, considering the randomization process, the appropriate description of methods, the report of losses and exclusions, among others. According to the authors, a test that reaches less than three points is of low methodological quality. Two independent researchers performed the search and selection of articles.

2.2. Inclusion and exclusion criteria

The original articles included in this study tested the effects of acute and/or chronic exercise on animal models of PAH. The exclusion criteria were:

- Review articles;
- Studies with humans;
- Articles without intervention with physical exercise;
- Repeated studies;
- Studies using pharmacological agents other than those for the development of PAH.

Initially, the authors approved the articles by reading the title to check if they met the objectives of the study. After verifying the inclusion and exclusion criteria of the study, the selected articles were analyzed in order to extract the data of interest. The flowchart of the search and selection process is shown in figure 1.

2.3. Data analysis

The analysis of the articles sought to extract data related to the PAH model, exercise protocol and tolerance, the myocardium functional and structural adaptations to exercise as well as the cellular and molecular related mechanisms, and survival.

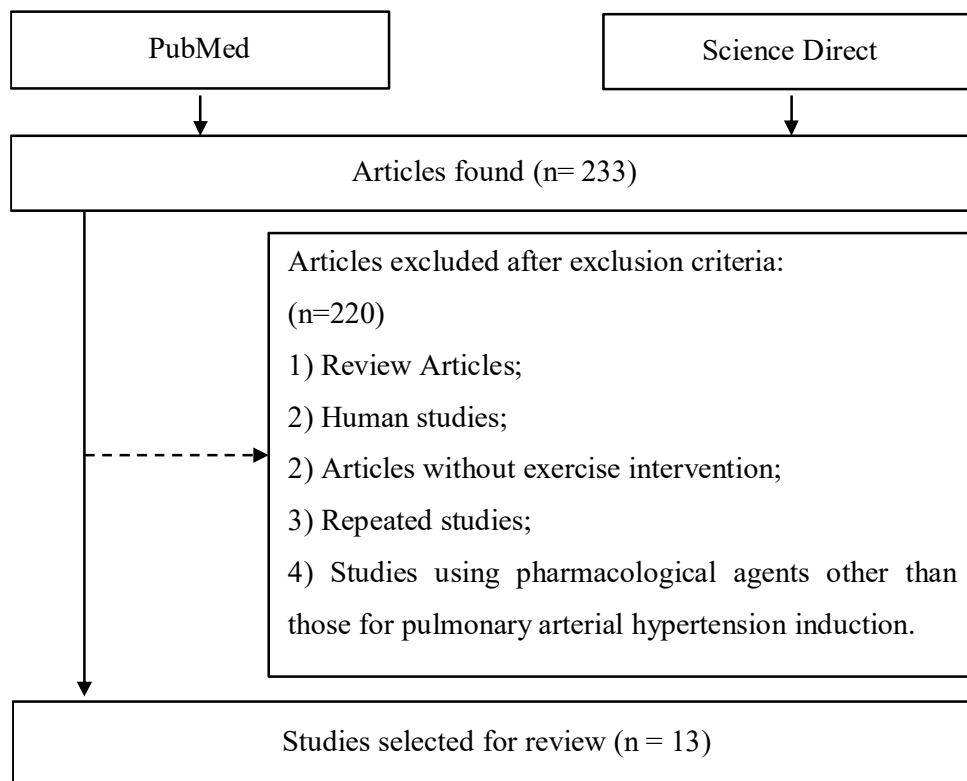


Figure 1. Diagram of the article selection process.

3. Results

3.1. Animal models

The analyzed parameters related to animal models are presented in table 1. In the majority of studies, 84.6% (n = 11), male Wistar rats with body mass between 130 and 320 g were submitted to the experimental protocols for the development of PAH [15-18, 27-33]. Only 15.4% (n=2) of the studies used Sprague-Dawley rats weighing approximately 300 g [34, 35]. For the induction of PAH, a single intraperitoneal injection of 40, 50 or 60 mg/kg of monocrotaline was administered, where the animals developed stable PAH (dose: 40 mg/kg body weight [16, 31]) or progressive PAH (50-60 mg/kg body weight [15-18, 27-30, 32-34]).

Monocrotaline [(3R, 4R, 5R)-4,5,8,10,12,13,13aR,13bR-actahydro-4,5-dihydroxy-3,4,5-trimethyl-2H-[1,6]dioxacycloundecino[2,3,4-g]pyrrolizine-2,6(3H)-dione], molecular formula ($C_{16}H_{23}NO_6$) and molecular weight (325,361 g/mol) is a plant-derived toxin

(*Crotalaria spectabilis*) that causes damage to endothelial cells, massive subsequent mononuclear infiltration in the perivascular regions of the arterioles and pulmonary arteries and, when applied in rats, leads to the development of stable or progressive PAH in approximately three weeks [36-38].

In addition to monocrotaline-induced PAH, only one study used a pharmacological agent called Sugeng 5416 (SU5416), a vascular endothelial growth factor receptor antagonist, with subsequent exposure of the animal to normobaric hypoxia (10% O₂) for 3 weeks [35]. The combination of SU5416 (20 mg/kg body weight) with chronic hypoxia is known to cause lesions in the pulmonary arteries and arterioles in rats and consequently lead to PAH [39].

3.2. Exercise training protocols

In the selected studies, continuous exercise (i.e. running on treadmill) and intermittent exercise (i.e. voluntary wheel running) were used as intervention protocols (Table 1). The treadmill running intensity was determined by different parameters, such as percentage of maximum oxygen consumption (% VO_{2max}) (n = 08), percentage of VO₂ reserve (% VO_{2R}) (n = 01), lactate threshold (n = 01) and running speed (n = 02). Thus, exercise intensities varied between 50-70% VO_{2max} [15, 16, 27, 28, 30-33], 75% % VO_{2R} [34], running speed in which the lactate threshold did not exceed 1.0 mmol/L[29] and proposed running speed of 30m/min [17, 35]. To determine the VO_{2max}, % VO_{2R} and lactate threshold, progressive treadmill running protocols were performed. Only one study used the voluntary wheel running [18]. This type of exercise is considered intermittent running, since the animals (rats) intercalate rest periods with periods of ~ 2 minutes of running in intensities that can reach 45m/min (high intensity) and a heart rate above 500bpm [40, 41].

The exercise training protocols in 76.9% (n = 10) of the studies, lasted 2-4 weeks after the PAH induction, being interrupted when the clinical signs (i.e. 10% loss of body weight overnight, dyspnea and piloerection) were present in the animals. With the exception of the voluntary wheel running program [18], where animals exercise free seven days per week, treadmill running sessions were conducted five days a week (i.e. Monday to Friday), lasting 50-60 minutes [15, 17, 27-29, 32, 33] or 30 minutes of continuous exercise per session [16, 31]. Regarding the acute exercise protocol, one selected study used a single treadmill running session of 45 min [34] and another one used treadmill running progressive test until fatigue on the fifth, eighth, and thirteenth weeks throughout the experiment [35].

For all treadmill running protocols studied, the animals were submitted to one- to two-weeks of adaptation, with progressive intensity (speed) and duration, until reaching the intensity and duration planned for the exercise training.

Table 1. Animal models, exercise protocols and main effects on cardiac function and structure.

Study	Animal strain and BW	Drug dosage	Exercise protocols	Main Effects	Qualification (Jadad et al., 1996) ²⁵
Souza-Rabbo, et al., 2008.	Male Wistar rats. (160 -180 g)	Monocrotaline (60 mg/kg BW)	Treadmill running (50 min, 5 d/wk, 5 wk) at 0.9 km/h.	↓ pRVH; ↑ Survival	4
Handoko et al., 2009.	Male Wistar rats. (150 -175 g)	Monocrotaline (60 mg/kg BW)	Treadmill running (30 min, 5 d/wk, 4 wk) at 50% VO ₂ max.	↔ CO ↓ Collagen deposition ↓ Fibrosis ↑ RV capillarization ↓ Survival in progressive PAH ↑ Exercise capacity in stable PAH	5
Colombo et al., 2013.	Male Wistar rats (139 ± 15 g).	Monocrotaline (60 mg/kg BW)	Treadmill running (60 min, 5 d/wk, 3 wk) at 60% VO ₂ max.	↓ PA thickness ↓ RV interstitial volume ↑ myocardial capillarity ↓ EDP	5
Colombo et al., 2015.	Male Wistar rats. (146 ± 16 g)	Monocrotaline (60 mg/kg BW)	Treadmill running (60 min, 5 d/wk, 3 wk) at 60% VO ₂ max.	↔AT/ET ↓ pRVH ↓ Hydrogen Peroxide ↑ p-Akt ↓ Apoptotic proteins ↓ RVSP ↑ eNOS activity	5
Brown et al., 2015.	Male Sprague–Dawley rats. (300g)	Monocrotaline (50 mg/kg BW)	Treadmill running (45 min at 75% reserve VO ₂).	↑ eNOS activity	5
Hargett et al., 2015.	Male Sprague–Dawley rats (160 – 200 g)	Sugen 5416 (20 mg/kg BW)	Treadmill running (3 sessions).	↔ Exercise capacity	4
Colombo et al., 2016.	Male Wistar rats. (315 ± 34 g)	Monocrotaline (60 mg/kg BW)	Treadmill running (60 min, 5 d/wk, 3 wk) at 60% VO ₂ max.	↔ RV SF ↔ RV DF ↑ FAC ↑ RV FS	5
Natali et al., 2015.	Male Wistar rats. (200 g)	Monocrotaline (60 mg/kg BW)	Voluntary running (3 to 4 weeks).	↓ pRVH ; ↑ Survival; ↓cardiac remodeling; ↑ myocyte contractility	4

Table 1. (Continued)

Study	Animal strain and BW	Drug dosage	Exercise protocols	Main Effects	Qualification (Jadad et al., 1996) ²⁵
Moreira-Gonçalves et al., 2016.	Male Wistar rats (~150 g)	Monocrotaline (60 mg/kg BW)	Treadmill running (60 min, 5d/wk, 2 or 4 wk) at 30 m/min.	↓ pRVH; Restored RHR; Restored EDP and TAU; Restored MAICR; ↑ TAPSE; ↓ BNP; ↔ SERCA2a; ↓ Collagen; ↓ β/αMHC; ↓ ET-1; ↑ VEGF; ↓ TNF-α; ↑ Survival.	5
Nogueira-Ferreira et al., 2016.	Male Wistar rats. (150 g)	Monocrotaline (60 mg/kg BW)	Treadmill running (60 min, 5 d/wk, 4 wk) at 25m/min.	Prevented BW decrease; ↓ PA hypertrophy; ↓ β/αMHC; ↔ Atrogin-1; ↓ pRVH; Restored EDP,TAU; ↓ Fibrosis; ↓ Inflammation;	5
Pacagnelli et al., 2016.	Male Wistar rats. (206 ± 16 g)	Monocrotaline (60 mg/kg BW)	Treadmill running (60 min, 5 d/wk, 11 wk) blood lactate < 1mmol/l.	Restored PA flow; ↓ pRVH ↓ LPO ↑ SOD activity	4
Enache et al., 2017.	Male Wistar rats. (224 ± 8 g)	Monocrotaline (40 mg/kg BW)	Downhill (15°) treadmill running (33 min, 5 d/wk, 4 wk) at 65% VO ₂ max.	↓ pRVH; ↔ Survival	4
Zimmer et al., 2017.	Male Wistar rats. (100 ± 20 g)	Not Reported	Treadmill running (60 min, 5 d/wk, 3 wk) at 60% VO ₂ max.	↓ AT/ET.	5

AT/ET, acceleration time to ejection time ratio; BNP, brain natriuretic peptide; BW, body weight; CO, cardiac output; DF, diastolic function; EDP, end-diastole pressure; eNOS, nitric oxide synthase enzyme; FS, fractional shortening; LPO, lipid peroxidation; MHC, myosin heavy chain; MAICR, myocardial acceleration in isovolumetric contraction and relaxation; PA, pulmonary artery; PAH, pulmonary arterial hypertension; RHR, resting heart rate; pRVH, pathological right ventricle hypertrophy; SOD, superoxide dismutase; SP, systolic pressure; SF, systolic function; TAU, time constant of isovolumetric relaxation; PVR, peripheral vascular resistance; VEGF, vascular endothelial growth factor; ↑, increase; ↔, maintenance; ↓, decrease.

3.3. Cardiac functional adaptations

In seven studies (53.84%) the authors evaluated the hemodynamic function of the animals by echocardiography (Table 1) [16, 27-31, 34]. They showed that monocrotaline injection (i.e. 40 or 60 mg/kg body weight) resulted in increased peripheral vascular resistance [17, 32], systolic blood pressure and diastolic pressure in the RV [16, 27, 28, 31-33], and end-systolic volume-pressure relationship. Monocrotaline also impaired the diastolic function [17], reduced the heart rate [17, 27], caused premature development of heart failure, worsened RV contractility and relaxation, and decreased pulmonary artery flow velocity [16, 29]. It was also observed that the rate of acceleration/ejection time of the pulmonary artery was lower in the animals with PAH [30, 32, 33]. Taken together, these results evidence heart failure induced by PAH characterized by RV dysfunction.

During exercise (i.e. acute effects), animals with PAH presented a reduction in RV systolic pressure measured after a single treadmill running session for 45 min eliciting 75% $\text{VO}_{2\text{R}}$ [34]. Regarding the chronic effects of exercise on the cardiac hemodynamics of animals with PAH, different benefits such as normalization of the pulmonary artery flow velocity [29], maintenance of RV systolic pressure [28] and of the end-diastolic pressure and ventricular pressure decay time, and attenuation of the RV systolic and diastolic dysfunction [30] were observed. In addition, reestablishment of resting heart rate, reduction of changes in the myocardial acceleration during isovolumetric contraction and isovolumetric relaxation time, as well as inhibition of changes in the maximum systolic velocity of the tricuspid annular plane and in the eccentricity index were found [17].

Moreover, when performed prior to PAH induction (pre-PAH), exercise training normalized end-diastolic pressure and diastolic function, and decreased the Fulton index [i.e. ventricular weight/(left ventricular + septum weight)] [27]. Furthermore, the study by Handoko and colleagues demonstrated that a treadmill training program (30 min/day; at $\sim 50\% \text{VO}_{2\text{max}}$) for four weeks in animals with progressive and stable PAH caused a more pronounced decrease in the cardiac output (CO) of animals with progressive PAH, as compared to those in the control group, whereas a lower change in CO was observed in animals with stable PAH than in their controls [16].

At the cellular level, PAH also causes impairment in the contractile function of cardiomyocytes. In this sense, Natali and colleagues [18] evaluated the effects of voluntary running during the development of PAH (i.e. $\sim$ four weeks) on the contractile function of cardiomyocytes isolated from the RV of rats, in response to different stimulation frequencies

(1Hz, 3Hz, 5Hz and 7Hz). They observed that exercise improved the contractile function of cardiomyocytes from monocrotaline-treated animals prior to the development of cardiac failure compared to cardiomyocytes from animals that developed cardiac failure, which was translated into raised survival of trained animals.

3.4. Cardiac structural adaptations

Because of RV overload, PAH also causes cardiac structural adaptations or remodeling. In all the studies analyzed (Table 1), it was observed that PAH leads to RV hypertrophy, demonstrated by augmented RV to body weight ratio, RV to left ventricle weight ratio and cross-sectional area of cardiomyocytes [15-18, 27-35]. Concerning the effects of exercise training (low- and moderate-intensity treadmill running, and intermittent wheel running), in six studies (46%) a reduction in PAH-induced RV hypertrophy was found [15, 18, 27, 29, 31, 35]. However, in other studies exercise training (i.e. moderate intensity) did not affect the PAH-induced RV hypertrophy [16, 28, 30].

Looking at the extracellular matrix level, sedentary animals with progressive PAH exhibit significantly high amounts of cardiac fibrosis [16, 17, 27]. Three to four weeks of moderate-intensity aerobic exercise performed prior to the development of PAH prevented this process, and low- and moderate-intensity exercise training post-PAH development decreased collagen deposition and cardiac fibrosis [16, 17, 27]. In respect to RV capillarization, which is decreased in stable PAH, five weeks of moderate-intensity exercise restored it to the values of control groups [16, 28].

The contractile function of cardiomyocytes is directly associated with Ca^{2+} ion homeostasis, which is involved both in the excitability of cardiomyocytes and in the activation of subcellular events, which activate the contractile filaments, promoting cellular contraction [42]. As for the expression of Ca^{2+} regulatory proteins in the RV, PAH is known to decrease gene and protein expressions of ryanodine receptors (RyRs), phospholamban (PLB) and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 2a (SERCA2a) [17, 29]. The study by Pacagnelli et al. [29] showed that 13 weeks of moderate-intensity exercise prior to PAH induction did not restore the reference values for RyRs, PLB and SERCA2a. On the other hand, Moreira-Gonçalves et al. [17] demonstrated that four weeks of moderate-intensity exercise performed immediately after PAH induction and that two-weeks of the same exercise started two weeks after PAH induction were able to reestablish the levels of PLB and SERCA2a to the normal levels of these proteins.

The effects of a moderate-intensity exercise for four weeks prior to and following the development of PAH on the myosin heavy chain (MHC) isoform profile in the RV were assessed [27]. Significant increases were observed in the total MHC isoforms ($\alpha + \beta$) and in the β/α MHC ratio in sedentary animals, and these changes have disappeared in animals submitted to exercise [27]. Moreira-Gonçalves and colleagues [17] also observed a significant augment in the β/α MHC ratio in animals with PAH, being moderate- intensity exercise for four weeks able to increase the MHC α isoform, thus decreasing the β/α MHC ratio. In this study, they also showed that brain natriuretic peptide (BNP) mRNA levels in the RV were significantly increased in animals with PAH, and when submitted to exercise training there was a normalization of BNP secretion. Moreover, they observed that PAH caused a decrease in the gene expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the RV of diseased animals, whereas exercise training preserved such decreasing.

The inflammatory response in the RV of rats with PAH is also changed. For instance, high levels of the pro-inflammatory cytokine (TNF- α) were found in the RV of animals with PAH [17, 27]. Although a 45 min-session of exercise at 75% VO_2R did not raise the number of inflammatory cells and did not trigger RV apoptosis in rats with PAH [34], animals submitted to a moderate-intensity exercise training for four weeks showed improvements in the inflammatory state [17]. For instance, Nogueira-Ferreira and colleagues [27] observed that animals submitted to moderate-intensity exercise training for four weeks had a reduction in the expression of tumor necrosis factor-inducing factor (TWEAK) receptors, compared to control group. TWEAK is a member of the TNF receptor superfamily, a cell surface associated transmembrane protein linked to stimulation of cell growth, induction of inflammatory cytokines and stimulation of apoptosis [43].

PAH also augments the expression of NF- $\kappa\beta$ subunits (p100/p52 and Rel- β) [27], which may be involved in the cellular response to stimuli such as oxidative stress, which plays a key role in regulating the immune response to infection [43]. Regarding exercise training, a moderate-intensity exercise program of four weeks prior to the development of PAH attenuated the overexpression of these NF- $\kappa\beta$ signaling mediators [27].

It has been shown that proteins involved in apoptosis such as Bax, Bcl-2 and caspase-3 [44] are altered in the RV of rats with PAH (i.e. increased Bax/Bcl2 ratio and caspase-3 activity) [32]. In this way, a moderate-intensity exercise training of five weeks was not able to alleviate the changed Bax/Bcl2 ratio, though it attenuated the expression of caspase-3, thereby diminishing apoptosis signaling [32].

The protein E3 ligase atrogin-1 involved in the muscular atrophy process is also increased in the RV of rats with PAH [27]. Notwithstanding, in animals submitted to an aerobic exercise program prior to the development of PAH the atrogin-1 expression did not increase, indicating a protective effect of exercise-training to the onset of cardiac remodeling in rats with PAH [27].

Taken together, the results presented here support the benefits of regular aerobic exercise to the cardiac structure and function in the PAH models. Despite some divergent results [16, 31], such benefits can be translated into improved exercise tolerance and survival of the animals [15, 17, 18].

4. Discussion

In this review we thought to point out the functional and structural adaptations of the myocardium to exercise training in animal models of PAH, and highlight the cellular and molecular mechanisms underlying the benefits of exercise. Looking at exercise variables (e.g. type, intensity and duration), we observed that aerobic exercise of moderate intensity both prior to and after PAH induction positively interferes with myocardial function and structure, besides increasing the exercise tolerance and survival of the animals.

Regarding the structure and hemodynamics of the myocardium, it was observed that aerobic exercise of low to moderate intensity (i.e. 30 to 60 min) for three to four weeks and intermittent exercise (voluntary wheel running) training during the development of PAH caused important cardiac adaptations, such as reduction of pathological RV hypertrophy, RV systolic pressure, normalization of pulmonary artery flow velocity, stabilization of RV systolic and diastolic functions, normalization of end-diastolic pressure and, consequently, normalization of diastolic function.

Concomitantly to hemodynamic adaptations, aerobic exercise of moderate intensity for about four weeks is capable of reducing collagen deposition and cardiac fibrosis, improving the profile of proteins that regulate cellular activities, preserving and/or decrease the β/α MHC ratio and improve the pathway of inflammatory responses that are impaired by PAH.

PAH imposes an adverse remodeling to the RV, including hypertrophy, associated with extended interstitial fibrosis, in response to pulmonary artery thickening and increased afterload [45]. Moreover, animals with PAH exhibit enlarged interstitial volume concomitant with excessive collagen increase in the extracellular matrix [46]. The accumulation of fibrosis

has a negative impact on cardiac function and hemodynamics, as it raises myocardial stiffness, promoting arrhythmias and damaging the tissue oxygen diffusion [47].

Sedentary animals with PAH have shown an increased β/α -MHC ratio which is associated with the reduced rate of the myosin ATPase enzyme, slowing the rate of myocyte contraction [48]. In this sense, aerobic exercise for four weeks performed either prior to or after PAH induction partially prevented cardiac hypertrophy as well as the overexpression of the β -MHC isoform and cardiac fibrosis [17, 27]. Such exercise adaptations contributed to the improvement of cardiac function and hemodynamics in animals with PAH.

The pathological cardiac responses induced by PAH differ from those physiological responses induced by aerobic exercise training, since the duration of the stimulus in response to physical training is intermittent, whereas in the pathology this stimulus is chronic. Therefore, it is possible the benefits of physical exercise on cardiac function and hemodynamics in patients with PAH are related to the physiological cardiac adaptations at the cellular level, such as augmented phosphorylation of Ca^{2+} regulatory proteins such as RyR2 and FLB [49, 50], normalization of SERCA2a and NCX activity, restoration of Ca^{2+} concentration of RS, reduction of diastolic Ca^{2+} leakage from SR and increase of transverse tubules [51], which contributes to attenuating myocardial dysfunction.

In this sense, studies evaluating the gene expression of Ca^{2+} regulatory proteins in the RV of rats with PAH showed that aerobic exercise training of moderate intensity for three to four three to weeks, was not able to reestablish the expression of RyR2, however, it restored the expression of SERCA2a to the normal levels [17, 29], which might have contributed to the improved RV contractile function in these animals. In fact, voluntary running improved the contractile function of single RV myocytes from monocrotaline-treated animals prior to the development of heart failure [18].

The exercise-induced benefits to cardiac microcirculation might be present in PAH individuals submitted to exercise since there is a direct link between angiogenesis, cardiac hypertrophy and cardiac function. For instance, insufficient cardiac microvascular growth has recently been identified as an important underlying mechanism in the transition from compensatory hypertrophy to heart failure [52]. In addition, promotion of cardiac angiogenesis restores relative capillary deficit, improves coronary flow reserve, and restores cardiac dysfunction under chronic pressure overload [53]. The effect of three weeks of moderate-intensity exercise (60 min/session) on the RV microcirculation of rats with PAH

was assessed. Such exercise training increased RV capillarization and reestablished the interstitial volume in these animals [28].

Inflammation is evident in cardiac diseases. TNF- α , for example, is known to increase pulmonary vascular reactivity and potentiate platelet-activating factor-induced vasoconstriction, which leads to RV dysfunction [54]. Additionally, the TWEAK receptor modulates multiple biological responses, such as proliferation, differentiation, inflammation, apoptosis, and angiogenesis, and was recently acknowledged to contribute to cardiac dysfunction in chronic heart failure, myocardial infarction [55] and PAH [56]. Furthermore, the transcription factor NF- κ B is involved in the regulation of cardiac hypertrophy and fibrosis in the diseased heart. The activation of the p65 subunit is related to cardiomyocyte survival and cardiac homeostasis, while the p50 subunit appears to antagonize the development of cardiac hypertrophy and fibrosis [27, 57]. In regard with the exercise benefits, exercise training of moderate intensity was able to counteract inflammation (i.e. reduced expression of TNF- α and NF- κ B) [17], and to diminish the expression of TWEAK receptors [27] in the heart of a rat model for PAH.

Changes in the ubiquitin/proteasome system are crucial for cardiac remodeling in response to pathological stresses. For instance, the regulation of muscle RING-finger protein-1 (MuRF1), atrogin-1 and TRAF6 E3 ligases have been shown to promote cardiac dysfunction [58]. Moreover, the transcription of atrogin-1 can be directly induced by FoxO3 through the IGF-1/PI3K/Akt signaling axis and its inhibition is related to the prevention of pathological cardiac hypertrophy [59]. Concerning the exercise influence, four weeks of moderate-intensity treadmill running prior to PAH induction prevented the increase in atrogin-1 expression in the heart of animals with PAH [27].

In healthy individuals, exercise may promote an acute reduction of pulmonary vascular resistance, secondary to vasodilation of blood vessels [60]. A study by Grunig and colleagues [61] evaluated the effects of physical exercise on patients with different types of PAH and revealed a reduction in exercise-induced resting pulmonary vascular resistance. In addition, the dominant vasoconstrictor component in resting PAH can be decreased by acute aerobic exercise of moderate intensity [34]. Such exercise benefit was attained through activation of eNOS and increased NO production.

The improvements in the myocardial function and structure are welcome to prevent the worsening of cardiac dysfunctions and, consequently, to provide a better quality of life to individuals with PAH. Therefore, information gained through the current review may be

useful in developing and implementing interventions to encourage continued participation in the exercise strategy of rehabilitation for such patients. As such, these results are important to professionals and to patients with PAH, inasmuch it provides a basis for understanding the mechanisms by which exercise training benefits the cardiac function, leading to enhanced exercise tolerance and survival in this population.

Finally, the findings on studies using animal models of PAH pointed out in this review give us a better understanding on the contributions of physical exercise to the health of patients with PAH, especially on the cellular and molecular mechanisms underlying the beneficial effects of exercise training performed either prior to or during the development of this disease. Therefore, we believe that regular physical exercise can mitigate the complications of PAH.

5. Conclusion

In conclusion, the most used model to study the effects of physical exercise on PAH so far is that induced by a unique intraperitoneal injection of MCT in Wistar rats. In this model, aerobic exercise training of moderate intensity performed either prior to or after PAH induction leads to improvements in the myocardial function and structure, observed at the cellular and molecular levels, and increases the exercise tolerance and survival of animals.

Disclosure of interests

The authors declare that they have no competing interest.

Acknowledgments

AJ Natali is a CNPq fellow.

6. References

- [1] McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, Barst RJ, Farber HW, Lindner JR, et al. ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(17):1573-619.
- [2] Voelkel NF, Quaife RA, Leinwand LA, Barst RJ, McGoon MD, Meldrum DR, et al. Right Ventricular Function and Failure. Report of a National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group on Cellular and Molecular Mechanisms of Right Heart Failure. 2006;114(17):1883-91.
- [3] Chin KM, Rubin LJ. Pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;51(16):1527-38. Epub 2008/04/19.
- [4] Ryan JJ, Huston J, Kutty S, Hatton ND, Bowman L, Tian L, et al. Right Ventricular Adaptation and Failure in Pulmonary Arterial Hypertension. *Canadian Journal of Cardiology*. 2015;31(4):391-406.
- [5] Colvin KL, Yeager ME. Animal Models of Pulmonary Hypertension: Matching Disease Mechanisms to Etiology of the Human Disease. *Journal of pulmonary & respiratory medicine*. 2014;4(4):198.
- [6] Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009;297(6):11.
- [7] McGoon MD, Benza RL, Escribano-Subias P, Jiang X, Miller DP, Peacock AJ, et al. Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(25 Suppl):D51-9. Epub 2013/12/21. doi: 10.1016/j.jacc.2013.10.023.
- [8] Troosters T, Casaburi R, Gosselink R, Decramer M. Pulmonary rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(1):19-38.
- [9] Piepoli MF, Davos C, Francis DP, Coats AJ. Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH). *Bmj*. 2004;328(7433):16.
- [10] Mereles D, Ehlken N, Kreuscher S, Ghofrani S, Hoeper MM, Halank M, et al. Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Circulation*. 2006;114(14):1482-9.
- [11] Weinstein AA, Chin LM, Keyser RE, Kennedy M, Nathan SD, Woolstenhulme JG, et al. Effect of aerobic exercise training on fatigue and physical activity in patients with pulmonary arterial hypertension. *Respir Med*. 2013;107(5):778-84.
- [12] Yuan P, Yuan XT, Sun XY, Pudasaini B, Liu JM, Hu QH. Exercise training for pulmonary hypertension: a systematic review and meta-analysis: *Int J Cardiol*. 2015;178:142-6.

- [13] Babu AS, Padmakumar R, Maiya AG, Mohapatra AK, Kamath RL. Effects of Exercise Training on Exercise Capacity in Pulmonary Arterial Hypertension: A Systematic Review of Clinical Trials. *Heart Lung Circ.* 2016;25(4):333-41.
- [14] Arena R, Cahalin LP, Borghi-Silva A, Myers J. The effect of exercise training on the pulmonary arterial system in patients with pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis.* 2015;57(5):480-8.
- [15] Souza-Rabbo MP, Silva LF, Auzani JA, Picoral M, Khaper N, Bello-Klein A. Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008;35(8):944-8.
- [16] Handoko ML, de Man FS, Happe CM, Schaliij I, Musters RJ, Westerhof N, et al. Opposite effects of training in rats with stable and progressive pulmonary hypertension. *Circulation.* 2009;120(1):42-9.
- [17] Moreira-Goncalves D, Ferreira R, Fonseca H, Padrao AI, Moreno N, Silva AF, et al. Cardioprotective effects of early and late aerobic exercise training in experimental pulmonary arterial hypertension. *Basic Res Cardiol.* 2015;110(6):015-0514.
- [18] Natali AJ, Fowler ED, Calaghan SC, White E. Voluntary exercise delays heart failure onset in rats with pulmonary artery hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;309(3):22.
- [19] Buys R, Avila A, Cornelissen VA. Exercise training improves physical fitness in patients with pulmonary arterial hypertension: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. *BMC Pulm Med.* 2015;15(40):015-0031.
- [20] Shoemaker MJ, Wilt JL, Dasgupta R, Oudiz RJ. Exercise training in patients with pulmonary arterial hypertension: a case report. *Cardiopulmonary physical therapy journal.* 2009;20(4):12-8.
- [21] Buys R, Avila A, Cornelissen VA. Exercise training improves physical fitness in patients with pulmonary arterial hypertension: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. *BMC pulmonary medicine.* 2015;15:40.
- [22] von Siebenthal C, Aubert JD, Mitsakis P, Yerly P, Prior JO, Nicod LP. Pulmonary Hypertension and Indicators of Right Ventricular Function. *Frontiers in Medicine.* 2016;3.
- [23] Ryan JJ, Huston J, Kutty S, Hatton ND, Bowman L, Tian L, et al. Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension. *The Canadian journal of cardiology.* 2015;31(4):391-406.
- [24] Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gotzsche PC, Ioannidis JP, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *Bmj.* 2009;21(339).
- [25] Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med.* 2009;6(7):21.

- [26] Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ, et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials*. 1996;17(1):1-12.
- [27] Nogueira-Ferreira R, Moreira-Goncalves D, Silva AF, Duarte JA, Leite-Moreira A, Ferreira R, et al. Exercise preconditioning prevents MCT-induced right ventricle remodeling through the regulation of TNF superfamily cytokines. *Int J Cardiol*. 2016;203:858-66.
- [28] Colombo R, Siqueira R, Becker CU, Fernandes TG, Pires KM, Valenca SS, et al. Effects of exercise on monocrotaline-induced changes in right heart function and pulmonary artery remodeling in rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2013;91(1):38-44.
- [29] Pacagnelli FL, de Almeida Sabela AK, Okoshi K, Mariano TB, Campos DH, Carvalho RF, et al. Preventive aerobic training exerts a cardioprotective effect on rats treated with monocrotaline. *International journal of experimental pathology*. 2016;97(3):238-47.
- [30] Colombo R, Siqueira R, Conzatti A, de Lima Seolin BG, Fernandes TR, Godoy AE, et al. Exercise training contributes to H2O2/VEGF signaling in the lung of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Vascul Pharmacol*. 2016;87:49-59.
- [31] Enache I, Favret F, Doutreleau S, Goette Di Marco P, Charles AL, Geny B, et al. Downhill exercise training in monocrotaline-injected rats: Effects on echocardiographic and haemodynamic variables and survival. *Arch Cardiovasc Dis*. 2017;20(16):30164-4.
- [32] Colombo R, Siqueira R, Conzatti A, Fernandes TR, Tavares AM, Araujo AS, et al. Aerobic Exercise Promotes a Decrease in Right Ventricle Apoptotic Proteins in Experimental Cor Pulmonale. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015;66(3):246-53.
- [33] Zimmer A, Teixeira RB, Bonetto JH, Siqueira R, Carraro CC, Donatti LM, et al. Effects of aerobic exercise training on metabolism of nitric oxide and endothelin-1 in lung parenchyma of rats with pulmonary arterial hypertension. *Mol Cell Biochem*. 2017;8(10):016-2937.
- [34] Brown MB, Chingombe TJ, Zinn AB, Reddy JG, Novack RA, Cooney SA, et al. Novel assessment of haemodynamic kinetics with acute exercise in a rat model of pulmonary arterial hypertension. *Exp Physiol*. 2015;100(6):742-54.
- [35] Hargett LA, Hartman LJ, Scruggs AK, McLendon JM, Haven AK, Bauer NN. Severe pulmonary arterial hypertensive rats are tolerant to mild exercise. *Pulm Circ*. 2015;5(2):349-55.
- [36] Dorfmueller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2003;22(2):358-63.
- [37] Buermans HP, Redout EM, Schiel AE, Musters RJ, Zuidwijk M, Eijk PP, et al. Microarray analysis reveals pivotal divergent mRNA expression profiles early in the development of either compensated ventricular hypertrophy or heart failure. *Physiological genomics*. 2005;21(3):314-23.

- [38] Hessel MH, Steendijk P, den Adel B, Schutte CI, van der Laarse A. Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2006;291(5):H2424-30.
- [39] Vitali SH, Hansmann G, Rose C, Fernandez-Gonzalez A, Scheid A, Mitsialis SA, et al. The Sugen 5416/hypoxia mouse model of pulmonary hypertension revisited: long-term follow-up. *Pulm Circ*. 2014;4(4):619-29.
- [40] Rodnick KJ, Reaven GM, Haskell WL, Sims CR, Mondon CE. Variations in running activity and enzymatic adaptations in voluntary running rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 1989;66(3):1250-7.
- [41] Russell JC, Epling WF, Pierce D, Amy RM, Boer DP. Induction of voluntary prolonged running by rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 1987;63(6):2549-53.
- [42] Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198-205.
- [43] Gilmore TD. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene*. 1999;18(49):6842-4.
- [44] Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther*. 2010;128(1):191-227.
- [45] Kuwahara K, Nakao K. New molecular mechanisms for cardiovascular disease:transcriptional pathways and novel therapeutic targets in heart failure. *J Pharmacol Sci*. 2011;116(4):337-42.
- [46] McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(4):255-62.
- [47] Harvey PA, Leinwand LA. Cellular mechanisms of cardiomyopathy. *J Cell Biol*. 2011 Aug 8;194(3):355-65.
- [48] Balakumar P, Jagadeesh G. Multifarious molecular signaling cascades of cardiac hypertrophy: can the muddy waters be cleared? *Pharmacol Res*. 2010;62(5):365-83.
- [49] Kolwicz SC, Kubo H, MacDonnell SM, Houser SR, Libonati JR. Effects of forskolin on inotropic performance and phospholamban phosphorylation in exercise-trained hypertensive myocardium. *J Appl Physiol*. 1985;102(2):628-33.
- [50] Libonati JR, Sabri A, Xiao C, Macdonnell SM, Renna BF. Exercise training improves systolic function in hypertensive myocardium. *J Appl Physiol*. 1985;111(6):1637-43.
- [51] Stolen TO, Hoydal MA, Kemi OJ, Catalucci D, Ceci M, Aasum E, et al. Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca²⁺ control, and SR Ca²⁺ release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. *Circ Res*. 2009;105(6):527-36.

- [52] Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, Schiekofer S, Ito M, Liao R, et al. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest.* 2005;115(8):2108-18.
- [53] Sano M, Minamino T, Toko H, Miyauchi H, Orimo M, Qin Y, et al. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature.* 2007;446(7134):444-8.
- [54] Wang Q, Zuo XR, Wang YY, Xie WP, Wang H, Zhang M. Monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension is attenuated by TNF-alpha antagonists via the suppression of TNF-alpha expression and NF-kappaB pathway in rats. *Vascul Pharmacol.* 2013;58(1-2):71-7.
- [55] Jasiewicz M, Kowal K, Kowal-Bielecka O, Knapp M, Skiepmo R, Bodzenta-Lukaszyk A, et al. Serum levels of CD163 and TWEAK in patients with pulmonary arterial hypertension. *Cytokine.* 2014;66(1):40-5.
- [56] Filusch A, Zelniker T, Baumgartner C, Eschricht S, Frey N, Katus HA, et al. Soluble TWEAK predicts hemodynamic impairment and functional capacity in patients with pulmonary arterial hypertension. *Clin Res Cardiol.* 2011;100(10):879-85.
- [57] Gaspar-Pereira S, Fullard N, Townsend PA, Banks PS, Ellis EL, Fox C, et al. The NF-kappaB subunit c-Rel stimulates cardiac hypertrophy and fibrosis. *Am J Pathol.* 2012;180(3):929-39.
- [58] Zhang D, Liu X, Chen X, Gu J, Li F, Zhang W, et al. Role of the MAPKs/TGF-beta1/TRAF6 signaling pathway in atrial fibrosis of patients with chronic atrial fibrillation and rheumatic mitral valve disease. *Cardiology.* 2014;129(4):216-23.
- [59] Schips TG, Wietelmann A, Hohn K, Schimanski S, Walther P, Braun T, et al. FoxO3 induces reversible cardiac atrophy and autophagy in a transgenic mouse model. *Cardiovasc Res.* 2011;91(4):587-97.
- [60] Naeije R, Vanderpool R, Dhakal BP, Saggar R, Vachiery JL, Lewis GD. Exercise-induced pulmonary hypertension: physiological basis and methodological concerns. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187(6):576-83.
- [61] Grunig E, Lichtblau M, Ehlken N, Ghofrani HA, Reichenberger F, Staehler G, et al. Safety and efficacy of exercise training in various forms of pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2012;40(1):84-92.

Capítulo 2: Corrida voluntária beneficia a estrutura e a função contrátil de miócitos do ventrículo direito em ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina

Leôncio L. Soares¹; Filipe R. Drummond²; Leonardo M. T. Rezende¹; Alexandre J. L. D. Costa¹; Tiago F. Leal¹; Meilene R. Fidelis¹; Clovis A. Neves²; Thales N. Prímola-Gomes¹; Miguel A. Carneiro-Junior¹; Emily C. C. Reis³; Antônio J. Natali¹.

1- Laboratório de Biologia do Exercício, Departamento de Educação Física, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil;

2- Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil;

3-Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil;

Resumo

Fundamento: A falha cardíaca direita é a principal causa de morte em pacientes com Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP). Diante de restrições no tratamento da disfunção do ventrículo direito (VD), estudos sobre estratégias para a manutenção da função cardíaca são necessários.

Objetivo: Examinar os efeitos do treinamento em corrida voluntária, realizado durante o desenvolvimento da HAP, sobre a estrutura do VD, a contratilidade e o cálcio (Ca^{2+}) intracelular transiente de miócitos isolados do VD de ratos com HAP induzida por monocrotalina (MCT).

Métodos: Ratos Wistar (~200g) foram divididos em cinco grupos: sedentário controle (SC, n=12); sedentário com falha cardíaca (SF, n=12); exercitado controle (EC, n=8); exercitado média (EM, n=12) e exercitado com falha cardíaca (EF, n=12). Os animais dos grupos EC, EM e EF tiveram livre acesso à roda de corrida voluntária. O grupo EM teve os parâmetros avaliados na média de sobrevida (± 1 dia) dos animais SF para comparação temporal. Os animais dos grupos EF, SF e EM receberam uma injeção intraperitoneal (60 mg/kg de peso corporal) de monocrotalina (MCT), enquanto os controles (EC e SC) receberam a mesma dose de solução salina. O tempo total até a fadiga (TTF) em corrida em esteira, um índice de tolerância ao esforço físico, foi medido antes da aplicação de MCT, nos 21º, 27º (grupos EC, EF, SC e SF) e no 23º (grupo EM) dias após aplicação. A avaliação ecocardiográfica foi realizada nos 22º, 25º (grupos: EC, EF, SC e SF) e 24º (grupo: EM) dias após a aplicação de MCT. Após manifestação dos sinais da falha cardíaca (SF, EF, EC e SC) parâmetros teciduais (histomorfometria) e celulares (contratilidade e Ca^{2+} intracelular transiente) foram avaliados. No grupo EM (n=8) isto ocorreu no 24º dia após injeção de MCT.

Resultados: O treinamento em corrida voluntária retardou o aparecimento dos sinais de falha cardíaca (SF = ~24 dias; EF = ~29 dias, $p < 0,05$), aumentou a tolerância ao esforço físico e retardou os prejuízos na resistência da artéria pulmonar (TA/TE). Em nível tecidual, nos animais EF, o treinamento aumentou a área de secção transversa de cardiomiócitos, enquanto no EM o treinamento retardou os prejuízos no percentual de cardiomiócitos reduzido pela HAP e o percentual de matiz extracelular aumentado pela HAP. Em nível celular, nos animais EM, o treinamento retardou a progressão dos prejuízos da HAP sobre os parâmetros de contratilidade (amplitude e tempos para o pico e para 50% de relaxamento) e de Ca^{2+} intracelular transiente (amplitude e tempos para o pico e para 50% de decaimento) em cardiomiócitos do VD.

Conclusão: O treinamento em corrida voluntária promove benefícios à estrutura tecidual do VD, assim como à contratilidade e ao Ca^{2+} intracelular transiente em miócitos isolados do VD de ratos com HAP induzida por MCT. Estas melhoras indicam contribuição positiva do exercício físico voluntário na tolerância ao esforço físico e para retardar o desenvolvimento da falha cardíaca nestes animais.

Palavras-chave: corrida voluntária; esforço físico; matriz extracelular; monocrotalina; falha cardíaca.

Abstract

Background: Right heart failure is the leading cause of death in patients with Pulmonary Arterial Hypertension (PAH). Faced with the restrictions in the treatment of right ventricular (RV) dysfunction, studies on strategies for the maintenance of cardiac function are necessary.

Objective: To examine the effects of training in voluntary running during the development of PAH on RV structure, contractility and transient intracellular calcium (Ca^{2+}) of myocytes isolated from RV of rats with monocrotaline-induced PAH (MCT).

Methods: Wistar rats (~ 200g) were divided into five groups: sedentary control (SC, n = 12); sedentary heart failure (SF, n = 12); exercised control (EC, n = 12); average exercised (AE, n = 12) and exercised with heart failure (EF, n = 12). Animals from groups EC, AE and EF had free access to the voluntary running wheel. The AE group had the parameters evaluated in the mean survival (± 1 day) of SF animals for temporal comparison. Animals of the EF, SF and AE groups received an intraperitoneal (60 mg/kg body weight) injection of monocrotaline (MCT), while control groups (EC and SC) received the same dose of saline solution. The total exercise time until fatigue (TTF) in treadmill running, a physical effort tolerance index, was measured before the application of MCT, and at 21st, 27th (EC, EF, SC and SF groups) and at 23rd (AE group) days after application. The echocardiographic evaluation was performed at 22nd, 25th (groups: EC, EF, SC and SF) and 24th (group: AE) days after the application of MCT. Tissue parameters (histomorphometry) and cellular parameters (contractility and transient intracellular Ca^{2+}) were evaluated after signs of heart failure (SF, EF, EC and SC). In the EM group (n = 8) this occurred on the 24th day after MCT injection.

Results: Training in voluntary running delayed the onset of signs of heart failure (SF = ~ 24 days, EF = ~ 29 days, $p < 0.05$), raised exercise tolerance and postponed reduction of pulmonary artery resistance (AT/ET). At the tissue level, in the AE group, exercise increased the cross-sectional area of cardiomyocytes, whereas in AE, it retarded the losses in the percentage of cardiomyocytes, reduced by PAH, and in the percentage of extracellular matrix, increased by PAH. At the cellular level, in AE animals, exercise delayed the progression of PAH impairments on the contractility parameters (amplitude and times for peak and for 50% relaxation) and transient intracellular Ca^{2+} (amplitude and times for peak and for 50% of decay) in cardiomyocytes of the RV.

Conclusion: Training such as voluntary running promotes benefits to the RV tissue structure as well as to contractility and transient intracellular Ca^{2+} in myocytes isolated from the RV of rats with PAH induced by MCT. These improvements indicate a positive contribution of

voluntary physical exercise in the tolerance of physical effort and retardment of heart failure in these animals.

1. Introdução

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) ocorre quando há um aumento crônico da resistência vascular pulmonar (RVP), o que resulta em pós-carga elevada e subsequente disfunção do ventrículo direito (VD) (1). Dados precisos da prevalência de HAP ainda não estão disponíveis, mas estima-se uma incidência anual de 2,4 a 7,1 casos por milhão e prevalência de 15 a 22 casos por milhão da população mundial (2). As terapias disponíveis para o tratamento da HAP visam, devido aos graves distúrbios hemodinâmicos, reduzir a pressão arterial pulmonar e consequentemente a pós-carga no VD (3). Levando em conta que a falha do VD é a causa mais comum de morte em pacientes com HAP, e diante de restrições no tratamento da disfunção do ventrículo direito (VD) (4), estudo sobre estratégias para a manutenção da função cardíaca são necessários. Apesar das diferenças na estrutura e função dos VD e VE (ventrículo esquerdo), tem sido proposto que os tratamentos para a falha do VE podem ser benéficos para a falha do VD na HAP (5).

O exercício físico tem sido reconhecido e recomendado como ferramenta terapêutica não farmacológica em várias doenças crônicas (6). Contudo, continua a ser testado se o exercício físico regular pode atenuar ou reverter as complicações impostas pela HAP. Modificações na estrutura e hemodinâmica do coração reduzem a capacidade funcional e a tolerância ao esforço físico em pacientes com HAP, devido ao menor débito cardíaco (7). Apesar destas limitações impostas pela HAP, crescem as evidências, em humanos (8-10) e em modelos animais (11-13), de que o exercício físico pode promover efeitos benéficos aos indivíduos com HAP. Os resultados positivos globais observados nos estudos com humanos são traduzidos por: melhora na qualidade de vida e na capacidade funcional, aumento da capacidade de exercício e da eficiência ventilatória e melhora da função cardíaca global (14, 15).

Em nível tecidual, em modelo de HAP com falha cardíaca induzida por MCT, o ventrículo direito apresenta hipertrofia patológica e dilatação associadas ao aumento da deposição de colágeno na matriz extracelular, inflamação, apoptose e fibrose, as quais prejudicam a função ventricular (16, 17). Neste caso, sabe-se que o exercício físico aeróbico contínuo de intensidades baixa e moderada (ex. corrida em esteira) contribui para a redução da deposição de colágeno e fibrose cardíaca, decréscimo na relação de miosinas de cadeia pesada beta e alfa (β/α MCP) e melhora das respostas inflamatórias (16, 18), o que tem impacto positivo na função ventricular. Em nível celular, cardiomiócitos do VD em modelos de HAP induzida por MCT comumente apresentam anormalidades no acoplamento excitação-

contração (19, 20). Na falha cardíaca induzida por MCT a homeostase de Ca^{2+} prejudicada contribui para que o cálcio (Ca^{2+}) intracelular transiente frequentemente seja menor e mais lento, o que conduz à disfunção contrátil e à redução da capacidade de responder a demandas contráteis (21). Por outro lado, sabe-se que, tanto na hipertensão arterial sistêmica quanto na falha cardíaca esquerda pós-infarto do miocárdio, o exercício físico é capaz de restaurar a amplitude de contração de cardiomiócitos, o que está associado a melhoras na dinâmica do Ca^{2+} intracelular transiente e a diminuição dos níveis diastólicos de Ca^{2+} . Em modelo de HAP induzida por MCT, todavia, apenas um estudo (11) demonstrou que o exercício intermitente (ex. corrida voluntária) realizado durante o desenvolvimento da HAP induzida por MCT é capaz de proporcionar benefícios à função contrátil de miócitos isolados do VD. Entretanto, os efeitos deste modelo de exercício sobre a dinâmica de Ca^{2+} intracelular não são conhecidos.

Desta forma, apesar dos conhecidos benefícios do exercício físico sobre a estrutura e a função cardíaca na HAP, os efeitos deste sobre o acoplamento excitação-contração, fundamental para a bomba cardíaca (22, 23), e sobre as alterações na regulação do Ca^{2+} intracelular que prejudica a contratilidade celular e, conseqüentemente, a estabilidade funcional do VD na falha cardíaca (24, 25) ainda não são completamente conhecidos em modelo de HAP induzida por MCT. Assim, o objetivo deste estudo foi examinar os efeitos do treinamento em corrida voluntária, realizado durante a fase de desenvolvimento da HAP, sobre a estrutura do VD, a contratilidade e o Ca^{2+} intracelular transiente de miócitos isolados do VD de ratos com HAP induzida por MCT.

2. Material e Métodos

2.1. Animais e Corrida Voluntária

Ratos Wistar machos (~200g) foram alojados individualmente em gaiolas de polycarbonato transparente (Modelo 80859S, Lafayette Instrument Company, Indiana, USA) equipada com rodas de atividade em aço inoxidável (diâmetro: 14" (35,56 cm); largura: 4,3" (10,92 cm) de livre acesso. O número de giros foi registrado usando-se contador magnético digital (Ciclocomputador-AS820 - Assize), o que permitiu o cálculo da distância diária percorrida. Estes animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: exercitado controle (EC, n=12), exercitado média (EM, n=12) e exercitado com falha cardíaca (EF, n=12). Outro grupo de ratos da mesma linhagem e com mesmo peso não tiveram acesso à roda de corrida e foram alojados aleatoriamente em gaiolas de polycarbonato transparente, sendo 4 animais por gaiola, e foram divididos em dois grupos: sedentário controle (SC, n=12)

e sedentário com falha cardíaca (SF, n=12). O grupo EM teve os parâmetros avaliados na média de sobrevivência (± 1 dia) dos animais SF para comparação temporal. Os demais grupos tiveram os parâmetros avaliados após manifestação de sinais clínicos de falha do VD. Os seguintes parâmetros foram avaliados: 1) Mensuração da contratilidade e Ca^{2+} intracelular transiente (n=8 por grupo) e 2) Análises histológicas da morfometria do VD (n=4 por grupo). Os demais parâmetros (Tolerância ao esforço físico e ecocardiográficos) foram avaliados em todos os animais em dias específicos conforme descrito posteriormente.

Diariamente, às 08h00min, foram registradas as variáveis: distância e duração do exercício de cada animal. Todos os animais tiveram acesso à água e ração *ad libitum* e permaneceram em sala silenciosa com ciclos de 12/12 h claro/escuro, temperatura controlada ($\sim 22^\circ \text{C}$) e umidade relativa de $\sim 60\%$. Os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (parecer nº 81/2016).

2.2. Indução da Hipertensão Arterial Pulmonar

Os animais dos grupos EF, SF e EM receberam uma única injeção intraperitoneal de 60 mg/kg de peso corporal de MCT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) dissolvida em solução salina (NaCl 140 mM; pH 7.4) para o desenvolvimento da HAP e/ou falha do VD (26). Animais controles (EC e SC) receberam a mesma dose de solução salina (NaCl 140 mM; pH 7,4).

2.3. Teste de tolerância ao esforço físico

O tempo total até a fadiga (TTF) foi usado como índice de tolerância ao esforço físico. O protocolo do TTF foi realizado conforme descrito anteriormente (27). Resumidamente, antes do início do programa de treinamento físico, os animais foram colocados em uma esteira rolante elétrica (AVS Projetos®, São Paulo, Brasil) para adaptação (10 min/dia, 0° de inclinação, 5m/min) por 3 dias. Quarenta e oito horas após o período de adaptação foi realizado o teste, onde os animais iniciaram o exercício a 5 m/min, 0° de inclinação. Foram feitos incrementos de 3m/min a cada 3 minutos até a fadiga. A fadiga foi determinada quando o animal permaneceu durante 10 segundos em uma grade com estímulo elétrico ajustado para 0,28 mA equipada junto a esteira. O teste foi realizado uma semana antes da aplicação de MCT em todos os grupos experimentais. No 21º dia após aplicação o teste foi feito nos grupos

EC, EF, SC e SF. No 23º dia após aplicação o teste foi feito apenas no grupo EM. No 27º dia após aplicação o teste foi feito nos grupos EC, EF, SC e SF.

2.4. Exame ecocardiográfico

A avaliação ecocardiográfica foi realizada no 22º e no 25º dias após a aplicação de MCT nos grupos EC, EF, SC e SF, e 24º dia no grupo EM. Os animais foram imobilizados por anestesia (Isoflurano 1,5% e oxigênio 100% em fluxo constante de 1L/min; Isoflurano, BioChimico, RJ, Brasil). As imagens foram obtidas enquanto os animais permaneciam em decúbito lateral. Estudos bidimensionais com taxa de amostragem rápida de 120 fps (*frame per second*) em modo M foram realizados utilizando-se o sistema de ultrassom MyLabTM30 (Esaote, Genoa, Itália) e transdutores de 11 MHz de frequência nominal. O ecocardiograma transtorácico bidimensional e o modo M foram obtidos em velocidade de varredura de 200mm ajustados de acordo com a frequência cardíaca. O fluxo da artéria pulmonar foi obtido por meio do Doppler pulsátil. As seguintes variáveis foram observadas: tempo de aceleração do fluxo na artéria pulmonar (TA) e seu tempo de ejeção (TE). Posteriormente, a razão TA/TE foi calculada. As imagens foram coletadas de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia e armazenadas para posterior análise (28).

2.5. Coleta de amostras

A eutanásia dos animais foi realizada quando os animais manifestaram sinais clínicos de falha do VD (ex. perda de 10 g do peso corporal de um dia para outro e/ou dispneia; cianose; letargia) e os seus controles no mesmo dia, exceto para o grupo EM que teve a eutanásia realizada na média de sobrevivência do grupo SF. No dia em que os animais injetados com MCT dos grupos EF e SF apresentaram os sinais clínicos de falha cardíaca, assim como seus respectivos controles (EC e SC), esses foram pesados e sofreram eutanásia por decapitação. Diferentemente, os animais do grupo EM sofreram eutanásia no 24º dia pós-injeção de MCT. Após eutanásia, o coração e os pulmões foram dissecados, pesados e processados para as análises de interesse, conforme descrito a seguir.

2.6. Análises histológicas e morfometria do ventrículo direito

Análises histológicas e morfometria do ventrículo direito foram realizadas conforme descrito anteriormente (29). Em suma, fragmentos de amostras do VD foram colhidos, fixados em formalina a 10%, desidratados em etanol, clarificados em xilol e embebidos em parafina.

Os blocos foram seccionados transversalmente em cortes histológicos de 5 µm de espessura e posteriormente corados com hematoxilina-eosina (H & E) e montados em lâminas de histologia. Para evitar análises repetidas da mesma área histológica, as seções foram avaliadas em semi-séries, usando uma de cada 10 secções. As lâminas foram visualizadas e as imagens capturadas usando um microscópio de luz (Olympus BX-50, Tóquio, Japão) conectado a uma câmera digital (Olympus Q Color-3, Tóquio, Japão). Posteriormente, foram realizadas as análises da área de secção transversa de cardiomiócitos e percentual de cardiomiócitos e matriz extracelular no VD. Para quantificação de matriz extracelular e cardiomiócitos, em doze imagens aleatórias para cada animal, foi sobreposta uma grade com 266 intersecções. Foram contabilizadas as intersecções em cardiomiócitos e matriz extracelular e então calculado a porcentagem. Nas mesmas imagens foram realizadas as medidas das áreas dos cardiomiócitos com ferramenta específica. Todas estas medidas foram realizadas utilizando-se o software Image-pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). As pranchas foram montadas com auxílio do programa GraphPad Prism 6.01.

2.7. Isolamento dos cardiomiócitos

Os miócitos do ventrículo direito foram isolados enzimaticamente, conforme descrito anteriormente (30). Resumidamente, após eutanásia, o coração foi rapidamente dissecado e canulado via aorta num sistema Langendorff adaptado e perfundido até a remoção completa do sangue com solução Tyrode contendo (em mM): 130 NaCl, 1,43 MgCl₂, 5,4 KCl, 0,75 CaCl₂, 5,0 Hepes, 10,0 glucose, 20,0 taurina e 10,0 de creatina, pH 7,3. A solução Tyrode foi trocada pela solução Tyrode contendo EGTA (0,1 mM) durante 5 min. Posteriormente, os corações foram perfundidos por ~10 minutos com solução Tyrode contendo 1 mg/mL de collagenase tipo II (Worthington, EUA) e 0,1 mg/mL de protease (Sigma-Aldrich, EUA). Em seguida, o coração digerido foi, então, removido da cânula e os ventrículos foram removidos e pesados. O ventrículo direito foi separado, pesado e cortado em pequenos fragmentos. Este tecido do ventrículo direito foi colocado em frasco cônico contendo a solução enzimática (collagenase e protease). As células foram separadas mecanicamente agitando-se o frasco durante 5 min. Em seguida, as células dispersadas foram separadas do tecido não disperso por filtração. Após centrifugação as células resultantes foram ressuspensas em solução Tyrode. O tecido não disperso foi submetido novamente ao processo de dispersão mecânica. Todas as soluções utilizadas no procedimento de isolamento foram oxigenadas (O₂ 100% – White Martins, Brasil) e mantidas a 37° C. As células isoladas foram armazenadas a 5° C até serem

utilizadas. Apenas cardiomiócitos quiescentes, tolerantes ao cálcio e com estrias claras e bem definidas foram analisados. Os cardiomiócitos isolados foram utilizados dentro de 2 a 3 horas após isolamento.

2.8. Mensuração da contratilidade celular

As contrações dos cardiomiócitos do VD foram mensuradas por meio da técnica de alteração do comprimento usando-se o sistema de detecção de bordas (Ionwizard, Ionoptix, EUA) montado num microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, Japão) equipado com uma lente objetiva de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, EUA), conforme descrito anteriormente (27). Em resumo, os cardiomiócitos isolados foram acomodados na câmara experimental montada no microscópio invertido e banhados por solução Tyrode contendo (em mM): 137 NaCl, 5,4 KCl, 0,33 NaH₂PO₄, 0,5 MgCl₂, 5 HEPES, 5,6 glucose, e 1,8 CaCl₂, (pH 7,4) em temperatura de 37° C. Esses foram estimulados externamente nas frequências de 1, 3, 5 e 7 Hz (40 Volts, duração de 5 ms) usando-se um estimulador elétrico (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, EUA). Os cardiomiócitos foram visualizados em um monitor por meio de uma câmera (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada ao microscópio invertido, utilizando-se um programa de detecção de imagens (Ionwizard, Ionoptix, EUA - frequência de 240 Hz). A partir dos registros obtidos, foram analisadas a amplitude de contração (variação do comprimento celular de repouso, %), tempo para o pico de contração e o tempo para 50% do relaxamento. Todos esses parâmetros foram determinados utilizando o programa IonWizard 6.3 (Ionoptix, EUA).

3.9. Mensuração do Ca²⁺ intracelular transiente

As medidas do Ca²⁺ intracelular transiente de cardiomiócitos isolados do VD foram realizadas conforme descrito anteriormente (31). Em suma, as medidas foram feitas utilizando-se um microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, EUA) equipado com uma lente objetiva de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, EUA). Os cardiomiócitos isolados foram incubados com o indicador fluorescente de Ca²⁺, permeável à membrana plasmática, Fura-2 ácido aminopolicarboxílico (Fura-2AM, ThermoFisher, Waltham, EUA). Esse marcador foi preparado em uma solução estoque a base de dimetilsulfóxido – DMSO (50 µl de DMSO em 50µg de Fura-2 AM). Adicionou-se 10µl dessa solução em 4 ml de meio celular contidos em tubo falcon envolvido com folha fina de alumínio. A solução foi agitada em superfície plana por 10 min (velocidade ± 120x/mim). Em seguida, o tubo foi centrifugado

(3.000 rpm), removeu-se o sobrenadante e os cardiomiócitos foram resuspendidos em 4ml de solução Tyrode contendo 750 mM de CaCl_2 . Após esse procedimento, os cardiomiócitos foram levados para um refrigerador (5° C) por 30 min. Todo esse procedimento descrito anteriormente foi realizado sem exposição da solução e células à luz. Após os 30 min de descanso, o Ca^{2+} intracelular transiente foi medido utilizando-se um sistema de excitação dupla que detecta a fluorescência excitada por luz UV com comprimento de 340 e 380nm (Ionoptix – EUA). Os cardiomiócitos incubados com Fura-2 foram colocados em uma câmara experimental, montada em um microscópio invertido, e foram banhados com solução Tyrode contendo (em mM): 137 NaCl, 5,4 KCl, 0,33 NaH_2PO_4 , 0,5 MgCl_2 , 5 HEPES, 5,6 glucose, e 1,8 CaCl_2 , (pH 7.4) em temperatura de 37° C. O cardiomiócito em avaliação foi posicionado dentro de uma janela ajustável, com bordas aparentes, e estimulados externamente nas frequências de 1, 3, 5 e 7 Hz (40 Volts, duração de 5 ms) usando-se um estimulador elétrico (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, EUA). A emissão de fluorescência foi detectada entre 340 e 380 nm, por um tubo fotomultiplicador. A fluorescência registrada é a razão entre as excitações de 340 e 380 nm. A partir dos registros obtidos, foram analisados: a amplitude do Ca^{2+} intracelular transiente (razão 340/380), o tempo para o pico do Ca^{2+} intracelular transiente (tempo compreendido desde a estimulação elétrica até a fluorescência máxima, ms) e o tempo para 50% do decaimento do Ca^{2+} intracelular transiente (tempo compreendido desde a fluorescência máxima até a metade do retorno à fluorescência basal, ms). Todos esses parâmetros foram determinados utilizando-se o programa IonWizard 6.3 (Ionoptix, EUA).

2.10. Análise estatística

A normalidade dos dados foi testada usando-se o teste Kolmogorov-Smirnov. Os dados da sobrevivência foram comparados usando-se a análise da curva de Kaplan-Meier pelo teste Log-rank. Os dados da distância percorrida (nos dias representativos 1, 8, 15 e 22) foram comparados usando-se a análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas e a correlação de Pearson foi utilizada para avaliar a relação entre distância total percorrida, tempo total de exercício e sobrevivência. Os dados de parâmetros celulares, peso corporal e peso de órgãos foram comparados usando-se ANOVA one-way ou Kruskal-Wallis, conforme normalidade de distribuição dos dados, seguidos de *post-hoc* apropriado para comparações múltiplas. O teste estatístico usado está especificado nas tabelas e figuras. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. $P < 0.05$ foi considerado para diferenças estatisticamente significantes. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism versão 6.01.

3. Resultados

3.1. Sobrevivência

A figura 1 apresenta os dados de sobrevivência dos animais dos grupos experimentais SF e EF. Embora todos os animais desses grupos tenham apresentado sinais de falha cardíaca, os animais do grupo EF tiveram média de sobrevida maior (29 dias) do que os do grupo SF (24 dias; $p < 0,05$), indicando benefícios do exercício físico. Além disso, houve correlação entre distância total percorrida e sobrevida ($r = 0,75$) e tempo total de exercício e sobrevida ($r = 0,75$), ambas estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

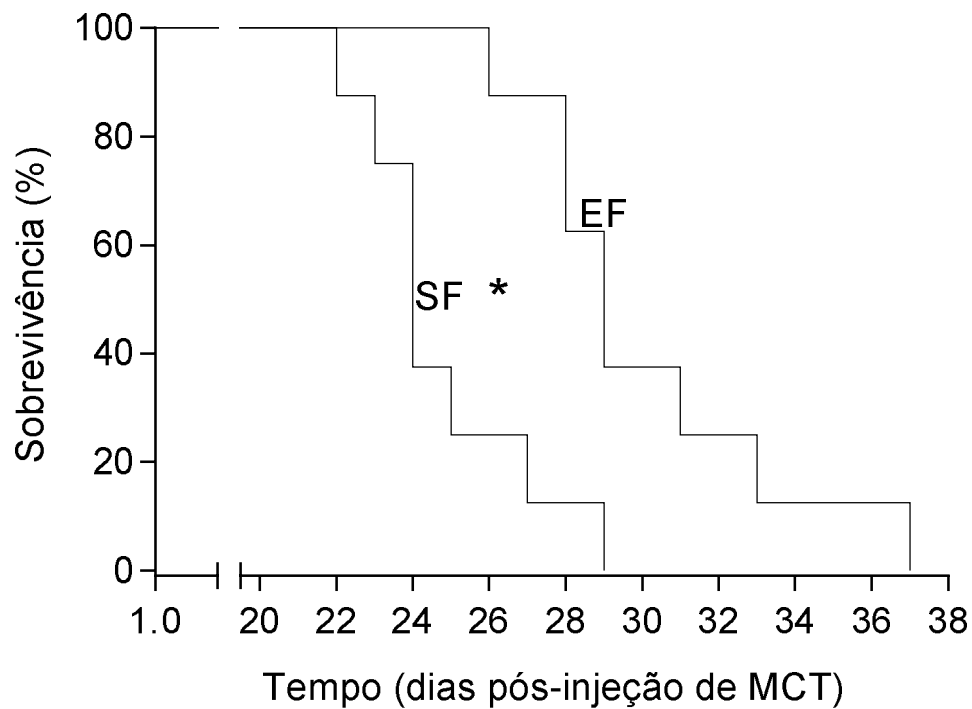


Figura 1. Sobrevivência medida nos dias de aparecimento dos sinais de falha cardíaca. SF, sedentário falha. EF, exercício falha. * $P < 0.05$, Curva Kaplan-Meier, com teste post-hoc Log-rank. $N = 7$ ratos em cada grupo.

3.2. Teste de tolerância ao esforço físico

Todos os animais que tiveram acesso à roda de corrida utilizaram a mesma (Fig. 2A). Os animais dos grupos EC, EF e EM correram em média 2-3 km/dia, não havendo diferenças significativas entre as distâncias percorridas nos dias representativos (1, 7, 14 e 21). A distância percorrida diariamente pelos animais do grupo EF começou a cair 1-2 dias antes da observação dos sinais de falha cardíaca.

Quanto ao TTF, não houve diferença entre as médias dos tempos entre os grupos SC, EC, SF, EF e EM antes da aplicação da MCT (Fig. 2B). Todavia, o TTF dos animais do grupo SF foi menor ($p < 0,05$) que o dos grupos EC e EF no 21º dia após a aplicação da MCT e menor ($p < 0,05$) no 21º comprado ao EM (avaliado no 23º dia) (Fig. 2C). No 27º dia após aplicação da MCT, entre os animais que sobreviveram (Fig. 2D), houve diminuição da tolerância ao exercício dos animais SF em relação aos do grupo EC ($p < 0,05$).

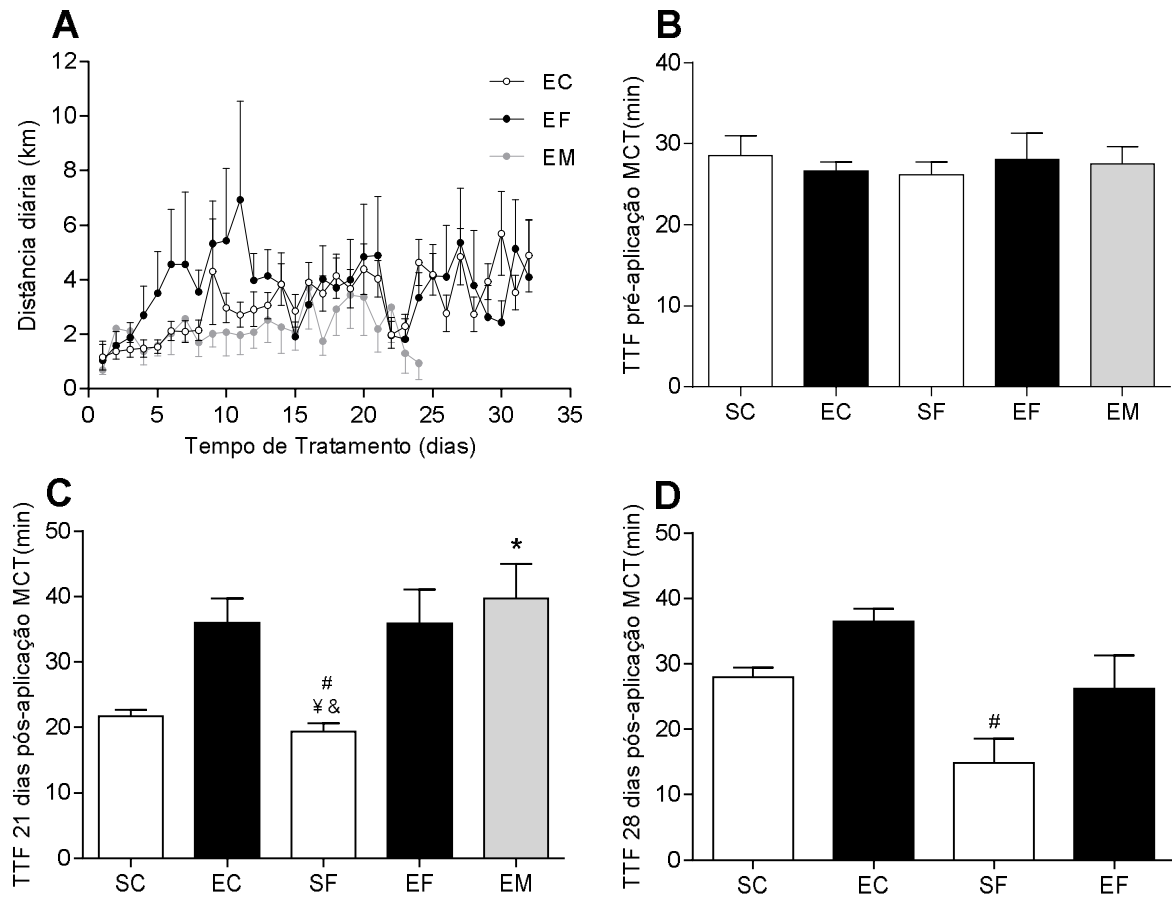


Figura 2. Tolerância ao exercício. (A) Distância percorrida. (B) Tempo total até a fadiga (TTF) medido antes da aplicação de monocrotalina (MCT); (C) TTF medido 21 dias após aplicação de MCT. (D) TTF medido 28 dias após aplicação de MCT. Dados são médias $\pm$ EPM de 7 ratos em cada grupo. SC sedentário controle; EC, exercício controle; SF, sedentário com falha; EF, exercício com falha; EM, exercício média. * $P < 0,05$ vs. SC; # $P < 0,05$ vs. EC; ¥ $P < 0,05$ vs. EF; & $P < 0,05$ vs. EM. One-way ANOVA de medidas repetidas para comparação dos dias 1, 8, 15, e 22 (Painel, A); One-way ANOVA para comparação entre os grupos (Painéis, B, C e D).

A figura 3 apresenta resultados do exame ecocardiográfico. No painel A, imagens representativas do fluxo da artéria pulmonar obtidas por meio de Doppler de onda pulsátil. No painel B, observa-se significativo decréscimo no TA/TE ($p < 0,05$) em animais do grupo SF (falha cardíaca) comparados aos dos grupos controles no 21º dia pós-injeção de MCT. No painel C, observa-se decréscimo significativo no TA/TE ($p < 0,05$) em animais do grupo SF e EF em comparação aos controles, SC e EC (25º dia pós-injeção de MCT). Todavia, animais do grupo EM (24º dia pós-injeção de MCT) apresentaram valores intermediários entre animais controle (SC e EC) e animais com falha (SF e EF). Esses resultados indicam que exercício físico pode minimizar e postergar o aumento da RVP da artéria pulmonar neste modelo de HAP induzida por MCT (Fig. 3).

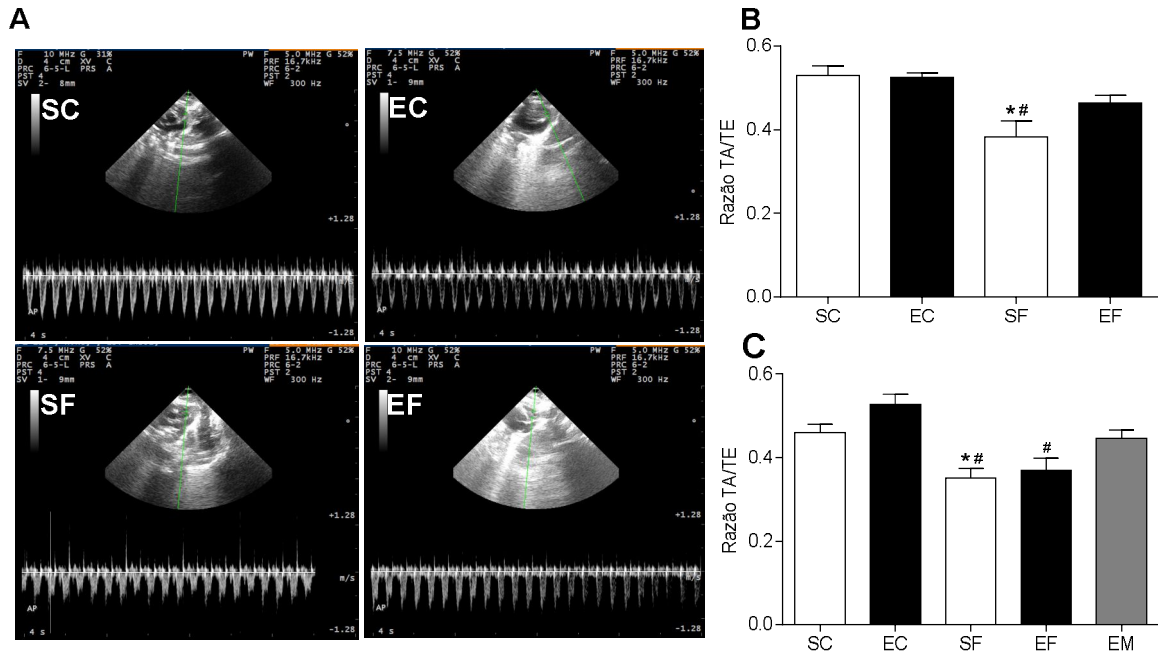


Figura 3. Dados ecocardiográficos. (A) Imagens representativas do fluxo da artéria pulmonar. (B) Relação tempo de aceleração/tempo (TA/TE) medido 21 dias após injeção de MCT. (C) TA/TE medido 24 dias após injeção de MCT. SC, sedentário controle; EC, exercício controle; SF, sedentário com falha; EF, exercício com falha; EM, exercício média. Dados são médias $\pm$ EPM de 5-7 ratos em cada grupo. One-way ANOVA: * $P < 0,05$ vs. SC; # $P < 0,05$ vs. EC.

Tabela 1. Peso corporal, dos órgãos e razões.

	SC	EC	SF	EF	EM
PC inicial, g	229,85 ± 5,69	227,42 ± 7,35	229,71 ± 6,09	222,14 ± 5,97	222,71 ± 8,15
PC final, g	306,00 ± 12,34	324,14 ± 10,66	273,16 ± 14,26 [#]	284,00 ± 7,40	290,66 ± 11,27
PCor, g	1,25 ± 0,05	1,18 ± 0,04	1,46 ± 0,05 [#]	1,54 ± 0,05 ^{*#}	1,40 ± 0,06 [#]
PV, g	1,29 ± 0,06	1,22 ± 0,09	1,57 ± 0,10	1,74 ± 0,14 ^{*#}	1,52 ± 0,05
PVD, g	0,25 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,39 ± 0,02 [*]	0,50 ± 0,04 ^{*#}	0,40 ± 0,03 [*]
PVE, g	0,89 ± 0,03	0,93 ± 0,07	0,92 ± 0,07	0,98 ± 0,05	1,08 ± 0,03
PP, g	1,54 ± 0,12	1,63 ± 0,07	3,18 ± 0,21 ^{*#&}	3,52 ± 0,29 ^{*#&}	2,32 ± 0,12
PV : PC, mg/g	4,15 ± 0,15	3,87 ± 0,24	5,89 ± 0,31 ^{*#}	6,27 ± 0,49 ^{*#}	5,22 ± 0,21 [#]
PVD : PC, mg/g	0,80 ± 0,03	0,95 ± 0,08	1,49 ± 0,12 ^{*#}	1,82 ± 0,11 ^{*#&}	1,38 ± 0,09 ^{*#}
PVD : PVE, mg/mg	0,27 ± 0,01	0,32 ± 0,03	0,43 ± 0,03 [*]	0,51 ± 0,03 ^{*#&}	0,37 ± 0,03
PVE : PC, mg/g	2,89 ± 0,06	2,94 ± 0,19	3,45 ± 0,14 [*]	3,55 ± 0,17 [*]	3,72 ± 0,15 ^{*#}
PP : PC, mg/g	4,05 ± 0,08	5,05 ± 0,14	11,67 ± 0,92 ^{*#&}	12,55 ± 1,27 ^{*#&}	7,96 ± 0,46 [*]

Dados são médias ± EPM de 5-7 ratos em cada grupo. SC, sedentário controle; EC, exercício controle; SF, sedentário falha; EF, exercício falha; EM, exercício média. PC, peso corporal; PCor, peso do coração; PV, peso dos ventrículos; PVD, peso do ventrículo direito; PVE, peso do ventrículo esquerdo; PP, peso do pulmão; ^{*}P<0.05 vs. SC; [#]P<0.05 vs. EC; [&]P<0.05 vs. EM. One-way ANOVA.

3.4. Peso corporal, peso dos órgãos e suas razões.

A tabela 1 apresenta os dados de peso corporal, peso dos órgãos e suas razões. O grupo SF apresentou menor peso corporal comparado ao grupo EC ($p < 0,05$). Animais dos grupos SF e EF apresentaram peso do coração, peso dos ventrículos, peso do VD, razão peso dos ventrículos pelo peso corporal, peso do VD pelo peso corporal, peso do VD pelo VE e VE pelo peso corporal maiores do que os de seus controles ($p < 0,05$), evidenciando hipertrofia patológica. O peso dos pulmões e a sua razão pelo peso corporal também foram maiores nos animais com falha cardíaca (SF, EF) quando comparados aos seus respectivos controles ($p < 0,05$). Por outro lado, o grupo de animais EM que tiveram acesso à roda de corrida, mas sofreram eutanásia antes de apresentarem os sinais de falha cardíaca, apresentaram valores dos parâmetros citados anteriormente, intermediários entre os grupos controles (SC e EC) e os com falha cardíaca (SF e EF). Isto evidencia efeito benéfico do exercício físico sobre o remodelamento patológico causado pela doença.

3.5. Morfometria histológica do ventrículo direito

A figura 4 apresenta resultados morfométricos de histologia do VD. O painel A mostra imagens representativas de cortes histológicos corados com H&E dos grupos experimentais. Visivelmente, observa-se que animais dos grupos SF e EF apresentaram maior quantidade de matriz extracelular e menor quantidade de cardiomiócitos em relação aos grupos SC, EC e EM. Os animais dos grupos SF e EF apresentam menor porcentagem de cardiomiócitos e maior porcentagem de matriz extracelular, em comparação aos grupos controle (SC e EC; $p < 0,001$) (Fig. 4B e C). O exercício físico foi capaz de retardar esses prejuízos no grupo EM, pois não é diferente do SC ($p > 0,05$). Além disso, os cardiomiócitos dos animais do grupo EF apresentaram maior área de secção transversa (Fig. 4D) que as dos animais controle ($p < 0,05$).

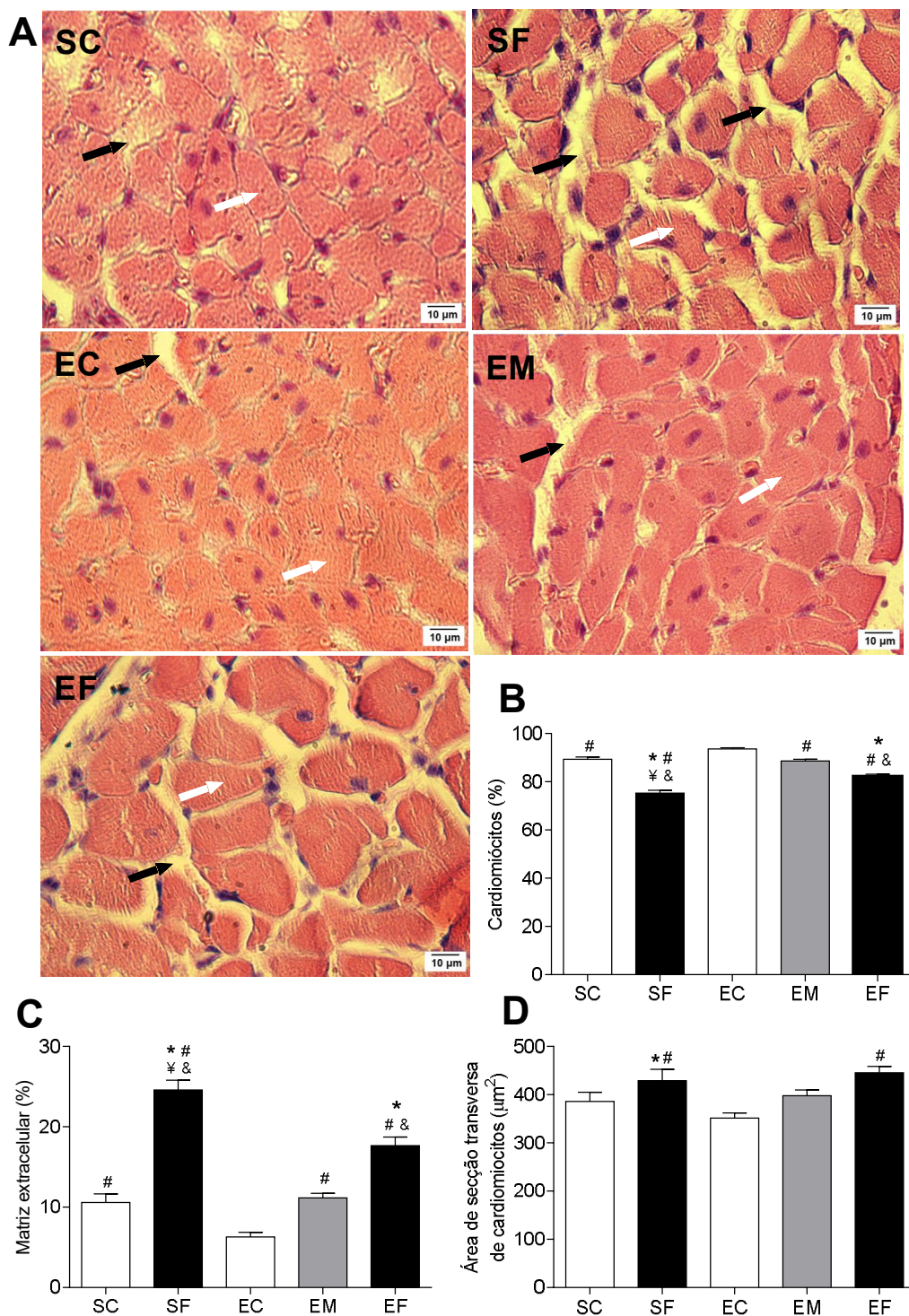


Figura 4. Parâmetros histológicos do VD. (A) Fotomicrografias representativas de tecido do ventrículo direito. (B) Porcentagem de cardiomiócitos. (C) Porcentagem de matriz extracelular. (D) Área de secção transversa de cardiomiócitos. Dados são médias $\pm$ EPM de 12 imagens por animal em cada grupo (n=4 ratos em cada grupo). SC, sedentário controle; EC, exercício controle; SF, sedentário com falha; EF, exercício com falha; EM, exercício média. One-way ANOVA: * $P < 0.05$ vs. SC; $^{\#}P < 0,05$ vs. EF; $^{\&}P < 0.05$ vs. EM. Setas brancas = cardiomiócitos; Setas pretas = matriz extra celular.

3.6. Contratilidade celular

A figura 5 apresenta os dados de contratilidade de cardiomiócitos isolados do VD estimulados a 1, 3, 5 e 7Hz. O painel A (Fig. 5A) apresenta traçado típico de encurtamento celular. No painel B (Fig. 5B), observa-se que os cardiomiócitos dos animais dos grupos SF e EF (com falha cardíaca) apresentaram menor amplitude de contração celular à frequência de estimulação de 3, 5 e 7 Hz em comparação aos dos seus respectivos grupos controles (SC e EC) e aos do grupo EM ($p<0,05$).

Quanto ao tempo para o pico de contração (Fig. 5C), cardiomiócitos dos animais dos grupos SF e EF, apresentaram maior ($p < 0,001$) tempo para o pico de contração, em relação aos dos grupos controles em todos os níveis de estimulação (1, 3, 5 e 7Hz). Em relação ao grupo EM, cardiomiócitos dos animais do grupo SF apresentaram maior tempo para o pico em 1, 3, 5 e 7 Hz, cardiomiócitos dos animais do grupo EF apresentaram maior tempo apenas em 1, 3 e 5 Hz ($p < 0,001$).

Em relação ao tempo para 50% do relaxamento (Fig. 5D), os cardiomiócitos dos animais dos grupos SF e EF apresentam maior tempo para o relaxamento em comparação aos dos respectivos grupos controles (SC e EC) e aos do grupo EM nas frequências de estimulação de 1, 3 e 5 Hz ($p<0,001$). Observa-se também que na frequência 3Hz, cardiomiócitos dos animais do grupo SF apresentaram maior tempo para 50% do relaxamento que os dos animais do grupo EF ($p<0,05$).

O painel E (Fig. 5E) mostra a proporção de células que responderam à estimulação de 7 Hz. Observa-se que a proporção de células dos animais dos grupos SF e EF foi menor que a dos seus respectivos controles (SC e EC, $p<0,05$). Em conjunto, esses resultados evidenciam um efeito prejudicial da doença sobre parâmetros contráteis de miócitos isolados do VD, enquanto o exercício exerce proteção sobre esses mesmos parâmetros.

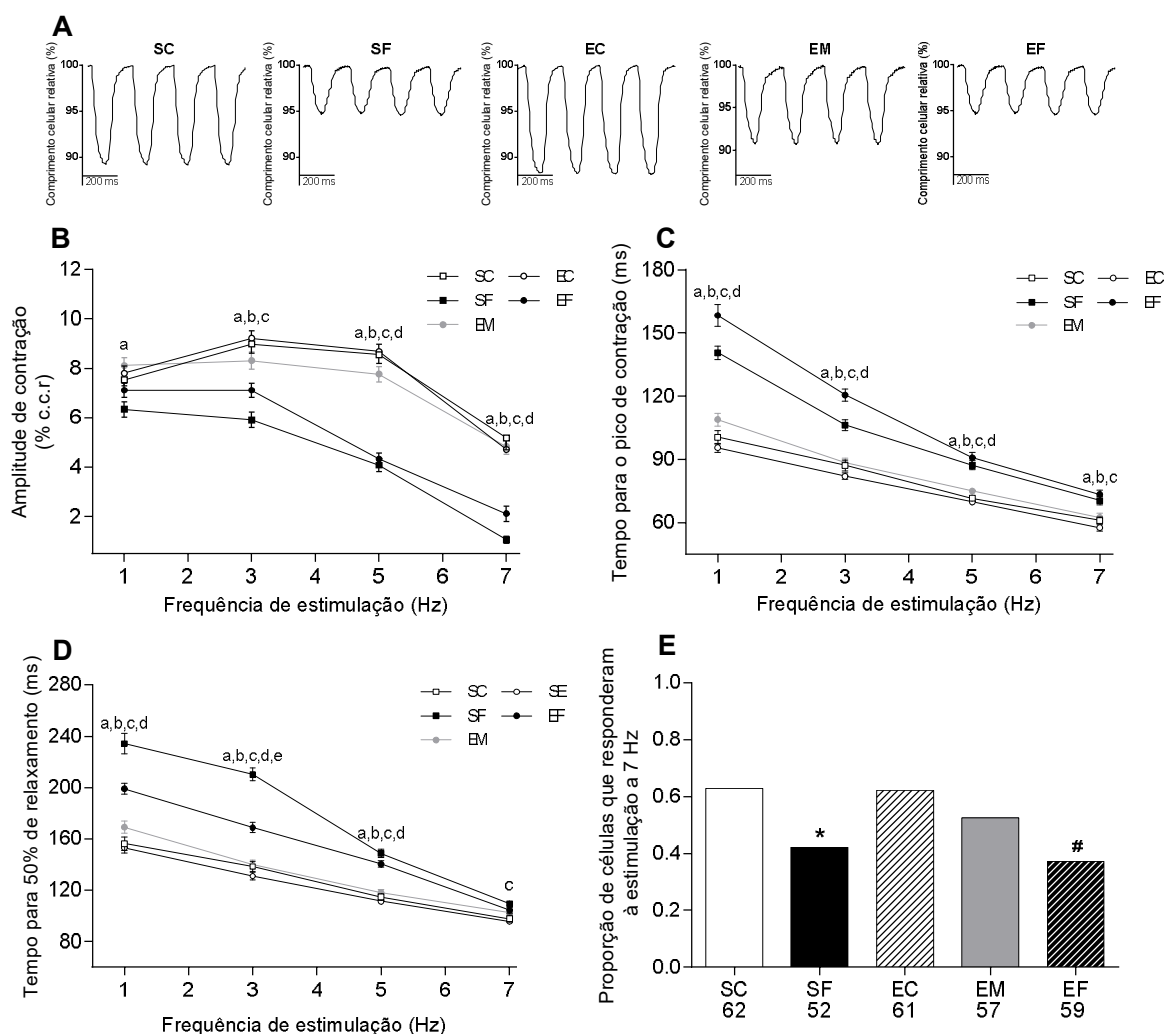


Figura 5. Contratilidade de cardiomiócitos isolados do ventrículo direito. (A) Traçados típicos de encurtamento celular (estimulação a 5 Hz). (B) Amplitude de contração. (C) Tempo para o pico de contração. (D) Tempo para 50% de relaxamento. (E) Proporção de células que responderam à estimulação a 7 Hz. SC, sedentário controle; EC, exercício controle; SF, sedentário com falha; EF, exercício com falha; EM, exercício média. Valores são médias $\pm$ EPM de 6-10 células por animal em cada grupo ($n=7$ ratos em cada grupo). Kruskal-Wallis, seguido de Dunn's: $P<0,05$, ^aEM vs. SF; ^bEC vs. EF; ^cSC vs. SF; ^dEM vs. EF; ^eEF vs. SF; ^fEC vs. SC; ^gEM vs. SC. Teste χ^2 , * $P<0,05$ vs. SC; # $P<0,05$ vs. EC. Número de cardiomiócitos que responderam a 1, 3 e 5 Hz estão apresentados no painel E.

3.7. Ca^{2+} intracelular transiente

A figura 6A apresenta traçados típicos do Ca^{2+} intracelular transiente de células isoladas do VD incubadas com Furas-2/AM (estímulo: 5Hz). A amplitude do Ca^{2+} intracelular

transiente nos cardiomiócitos dos animais do grupo EF foi maior que as dos grupos EC, EM e SF nas frequências de 1 e 3 Hz ($p < 0,05$) (Fig. 6B). Na frequência de 1Hz, células dos animais dos grupos EC e EM apresentaram maior amplitude do Ca^{2+} intracelular transiente que as do grupo SC ($p < 0,001$). Na frequência de 5 Hz, a amplitude do Ca^{2+} intracelular transiente nos cardiomiócitos dos animais do grupo EF foi maior do que a dos animais do grupo EM, SC e SF; enquanto o grupo EC apresentou valor médio maior do que seu controle SC ($p < 0,05$). Na frequência de 7 Hz, células dos animais dos grupos EM, SC e EF apresentaram maior amplitude do Ca^{2+} intracelular transiente, quando comparados às do grupo SF ($p < 0,05$).

No painel C (Fig. 6C), observa-se que cardiomiócitos dos animais dos grupos SF e EF (com falha) apresentaram maiores tempos para o pico do Ca^{2+} intracelular transiente nas frequências de 1 e 3Hz, quando comparados aos dos animais dos respectivos grupos controles (SC e EC) e aos do grupo EM ($p < 0,05$). Nas frequências de 5 e 7Hz, os tempos para o pico do Ca^{2+} intracelular transiente foram maiores nos cardiomiócitos de animais do grupo EF, comparados aos do grupo EC ($p < 0,001$).

Quanto ao tempo para 50% de decaimento do Ca^{2+} intracelular transiente (Fig. 6D), observa-se que as células dos animais dos grupos SF e EF (com falha) apresentam maiores tempos para 50% do decaimento nas frequências 1, 3 e 5 Hz, quando comparado aos dos seus respectivos controles (SC, EC) e aos do grupo EM ($p < 0,05$). Além disso, observa-se que na frequência de 1 Hz, os cardiomiócitos dos animais do grupo SC apresentaram maior ($p < 0,05$) tempo para 50% do decaimento, quando comparados aos dos animais dos grupos EC e EM.

Também foi analisada a proporção de células que responderam à estimulação de 7 Hz (Fig. 6E). Os cardiomiócitos dos animais do grupo EF apresentaram menor proporção de células que responderam a 7 Hz, em comparação aos dos grupos EC e EM ($p < 0,05$).

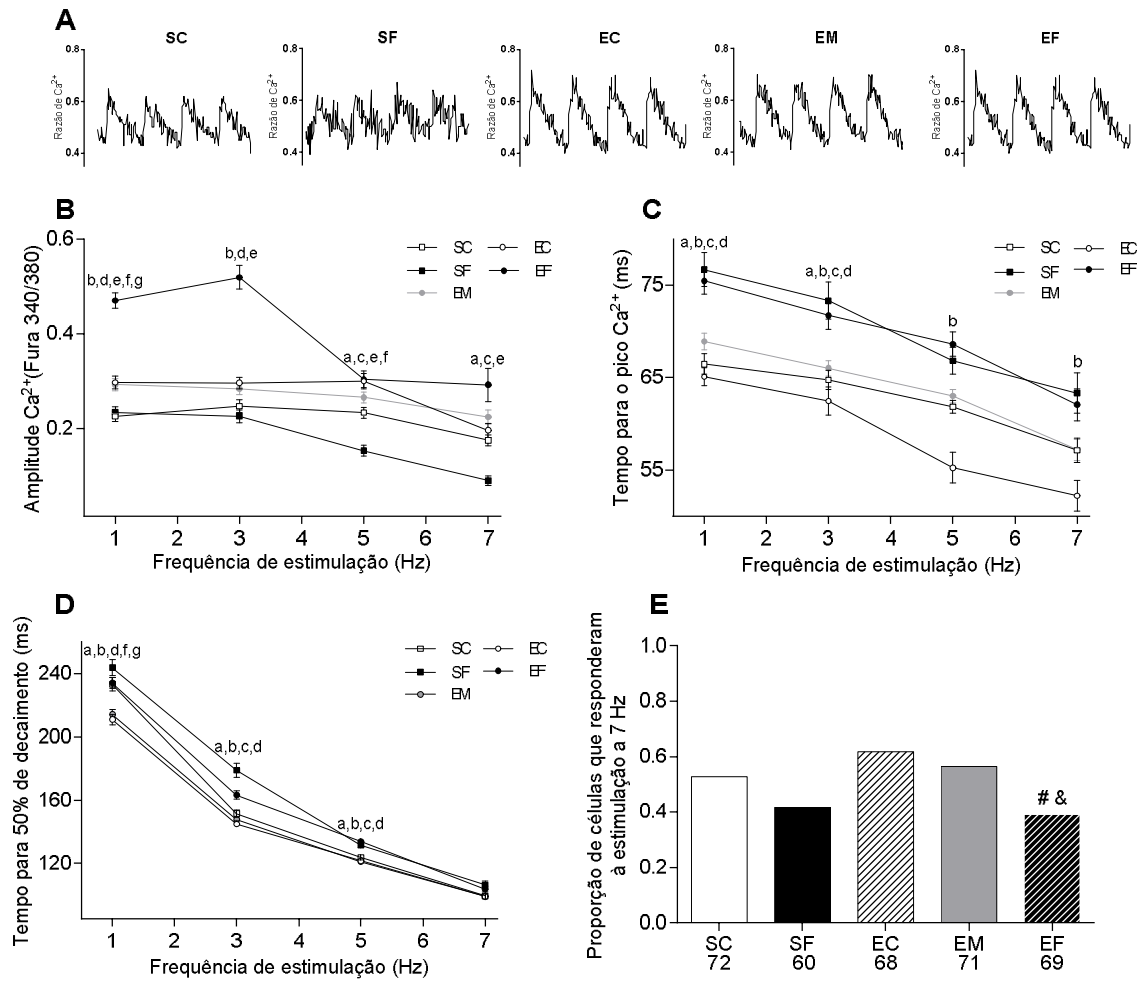


Figura 6. Ca^{2+} intracelular transiente de cardiomiocitos isolados do ventrículo direito. (A) Traçados típicos de Ca^{2+} intracelular transiente (estimulação a 5 Hz). (B) Amplitude. (C) Tempo para o pico. (D) Tempo para 50% de decaimento. (E) Proporção de células que responderam à estimulação a 7 Hz. SC, sedentário controle; EC, exercício controle; SF, sedentário com falha; EF, exercício com falha; EM, exercício média. Valores são médias $\pm$ EPM de 6-10 células por animal em cada grupo ($n = 7$ ratos em cada grupo). Painéis B, C, D: Kruskal-Wallis, seguido de Dunn's (^a $P < 0,05$, EM vs. SF; ^b $P < 0,05$ EC vs. EF; ^c SC vs. SF; ^d $P < 0,05$ EM vs. EF; ^e $P < 0,05$ EF vs. SF; ^f $P < 0,05$ EC vs. SC; ^g EM vs. SC). Painel E: Teste χ^2 ([#] $P < 0,05$ vs. EC; [&] vs. EM). Número de cardiomiócitos que responderam a 1, 3 e 5 Hz estão apresentados no painel E.

4. Discussão

No presente estudo foram examinados os efeitos do treinamento de corrida voluntária, realizado durante a fase de desenvolvimento da HAP, sobre a estrutura do VD, a contratilidade e o Ca^{2+} intracelular transiente de cardiomiócitos em ratos com HAP induzida por MCT. Ficou evidenciado que este tipo de treinamento físico aumenta a tolerância ao esforço físico, retarda a redução da resistência da artéria pulmonar e a progressão dos prejuízos da HAP na matriz extracelular e na contratilidade celular e Ca^{2+} intracelular transiente de miócitos isolados do VD. Estas melhoras indicam contribuição positiva do exercício físico voluntário para retardar o desenvolvimento da falha cardíaca nestes animais.

4.1. Sobrevivência e tolerância ao esforço físico

O modelo de exercício empregado aqui é considerado intermitente, uma vez que os ratos intercalam períodos de descanso com períodos de aproximadamente dois minutos de corrida em intensidades que podem atingir 45m/min (alta intensidade). Portanto, é um tipo de exercício diferente daquele aeróbico contínuo forçado empregado em diferentes estudos sobre este modelo HAP (12, 32, 33). Aqui, a corrida voluntária foi capaz de aumentar a tolerância ao exercício dos animais dos grupos com HAP (EF e EM), assim como nos animais sem HAP (EC). Mais importante, os resultados do presente estudo mostram também que o exercício físico voluntário é capaz de postergar o início dos sinais de falha cardíaca e, conseqüentemente, aumentar a sobrevivência de animais tratados com MCT, o que está de acordo com estudos prévios com corrida contínua em esteira (12, 34) e corrida voluntária (11). Diferentes fatores podem estar envolvidos com este aumento da sobrevivência destes animais, tais como melhoras na estrutura e na função do miocárdio, que favorecem o débito cardíaco. A seguir serão discutidos aqueles fatores avaliados neste estudo.

4.2. Hemodinâmica

Os animais do grupo sedentários com falha (SF) apresentaram aumento na resistência da artéria pulmonar, estimada pela diminuição da razão TA/TE, em relação ao controle. Este dado caracteriza o modelo de HAP empregado, pois este aumento é fator crucial para o remodelamento patológico do VD (17). O aumento da resistência vascular na HAP tem sido associado a uma perturbação entre fatores vasoconstritores e vasodilatadores endoteliais, sendo que vasodilatadores endógenos, incluindo a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), a enzima responsável pela produção do óxido nítrico (ON) e os níveis de prostanoídes, outra

classe de vasodilatadores, estão diminuídos, enquanto vasoconstritores (ex. endotelina-1 e tromboxano) que contribuem para enrijecimento e remodelação vascular estão aumentados (35).

Todavia, a razão TA/TE foi restabelecida nos animais do grupo EF e, naqueles do grupo EM, esta não diminuiu como nos animais SF, indicando benefício do treinamento, o que está de acordo com estudos prévios em modelos de HAP induzida por MCT (13, 36). O aumento da biodisponibilidade do ON é um efeito vascular importante do exercício físico, em função do aumento do estresse por cisalhamento e consequente síntese e liberação desse potente vasodilatador (37). Mais importante, o aumento alternado com redução do estresse de cisalhamento melhora a sinalização do ON em comparação a um cisalhamento constante (38). Isto foi demonstrado quando observou-se melhor função vascular em resposta ao treinamento intervalado de alta intensidade em comparação ao treinamento contínuo (39, 40). Particularmente, estudo prévio demonstrou que o treinamento intervalado de alta intensidade contribui para prevenção do remodelamento arterial patológico e diminuição da resistência vascular pulmonar em modelo de HAP (13). Desta forma, acredita-se que os benefícios do exercício de corrida voluntária sobre a razão TA/TE podem estar relacionados à maior síntese de ON na circulação pulmonar e ao atraso no remodelamento arterial patológico.

A diminuição da resistência da artéria pulmonar e da RVP são fundamentais para a redução da sobrecarga e do remodelamento patológico do VD, o que está associado à manutenção da função cardíaca (17). Em indivíduos com HAP, tem sido mostrado que o exercício físico melhora a função cardíaca, a eficiência ventilatória e a aptidão cardiorrespiratória, o que colabora para a melhora na capacidade funcional e qualidade de vida desses pacientes (8, 41, 42).

4.3. Morfometria do ventrículo direito e pesos

Os resultados do presente estudo mostraram que o VD de animais com falha (SF e EF), apresentaram proporcionalmente menor quantidade de cardiomiócitos e maior quantidade de matriz extracelular em relação aos grupos controle (SC e EC). Este resultado é uma resposta adaptativa do VD que momentaneamente compensa o aumento da resistência vascular pulmonar, mas que com o passar do tempo se torna deletéria. Isto resulta em hipertrofia associada à deposição de colágeno na matriz extracelular, apoptose e fibrose no miocárdio (12, 29) e, conseqüentemente, disfunção contrátil progressiva e falha cardíaca (1). Entretanto, nos animais do grupo EM, estas alterações negativas na matriz extracelular não

ocorreram, demonstrando o efeito protetor do exercício. O treinamento físico combate o remodelamento cardíaco patológico por diminuir os níveis circulantes e teciduais de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator nuclear kappa B (NF- κ B) e caspase-3, assim como a expressão de receptores do fator indutor de necrose tumoral (TWEAK), que estão envolvidos no aumento de radicais livres, processos pró-inflamatórios e apoptóticos no VD em modelos de HAP (16). A combinação da HAP com exercício físico resultou em aumento na área de secção transversa de miócitos isolados do VD nos animais com falha (EF). Este é um resultado inesperado, pois com a redução da resistência da artéria pulmonar a expectativa era de que, sob uma menor sobrecarga de pressão no VD, houvesse uma diminuição na área de secção transversa desses cardiomiócitos.

As razões do peso do VD pelo peso corporal e do VE, assim como o peso do pulmão e sua razão pelo peso corporal, foram maiores nos grupos SF e EF que no SC, evidenciando o efeito prejudicial da HAP, sem o efeito do exercício neste momento. De fato, a resposta hipertrófica à sobrecarga de pressão é considerada um mecanismo compensatório para normalizar o estresse elevado, o que em longo prazo está associado à deposição de colágeno na matriz extracelular, apoptose e fibrose no miocárdio (16, 17). Por outro lado, no grupo EM, estas razões ficaram com valores intermediários entre os grupos SC e EF. Isto indica que o exercício voluntário atrasou a progressão do remodelamento cardíaco em ratos com HAP induzida por MCT, conforme demonstrado em estudo prévio (11). Sabe-se que o exercício físico minimiza a RVP e, conseqüentemente, a hipertrofia do VD gerada pelo aumento da pós-carga em modelos de HAP induzida por MCT. De fato, observou-se no presente estudo que o treinamento em corrida voluntária reduziu a resistência da artéria pulmonar (TA/TE), o que está associada à diminuição da sobrecarga de pressão no VD.

4.4. Contratilidade celular

No presente estudo, observou-se que a HAP reduziu a amplitude de contração e aumentou os tempos para o pico de contração e para 50% de relaxamento, sem que o exercício tenha influenciado estes parâmetros neste estágio. A redução na amplitude de contração causada pela HAP tem sido associada à redução da sensibilidade dos miofilamentos contráteis ao Ca^{2+} e à redução da concentração intracelular de Ca^{2+} (20, 43). O aumento no tempo para o pico de contração, por sua vez, é devido ao maior tempo para o pico do Ca^{2+} intracelular transiente, caracterizado pela lentidão da liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) via canais receptores de rianodina (RyR2), enquanto que o maior tempo

para 50% do relaxamento é devido ao maior tempo para decaimento do Ca^{2+} intracelular transiente, caracterizado, principalmente pela lentidão na recaptação de Ca^{2+} do citosol para o RS via SERCA2a (Ca^{2+} ATPase do RS) (44). De fato, estudos prévios demonstraram que as proteínas SERCA2a e RyR2 estão reduzidas no VD de ratos com HAP induzida por MCT (12, 33).

Além disso, observou-se que os miócitos do VD de ratos com falha (SF e EF) apresentaram relação contração-frequência negativa (3, 5 e 7 Hz). Esta relação contração-frequência negativa tem sido observada neste modelo de HAP (11), sendo acompanhada por queda na amplitude do Ca^{2+} intracelular transiente (24, 25). Tal relação sugere a inabilidade destes cardiomiócitos em responder demandas contráteis aumentadas, característica da falha cardíaca (25). Neste sentido, observou-se nesses animais menor proporção de células que responderam à estimulação na frequência de 7Hz, em relação aos controles.

Por outro lado, os miócitos isolados do VD de animais do grupo EM apresentaram os parâmetros contráteis semelhantes aos dos grupos controles, e a proporção de células que responderam à frequência de 7Hz foi intermediária aos grupos controle e falha. Esses resultados evidenciam a proteção do treinamento empregado contra a progressão da HAP. Esta proteção está indicada pela melhor função contrátil dos cardiomiócitos isolados do VD destes animais do grupo EM, se comparados com a daqueles cardiomiócitos isolados dos animais que desenvolveram falha cardíaca (EF). Possivelmente, o exercício evitou a deterioração de proteínas reguladoras de cálcio nestes animais. Neste sentido, estudos prévios demonstraram que as proteínas SERCA2a e RyR2 foram aumentadas no VD de ratos com HAP induzida por MCT submetidos ao treinamento aeróbico de intensidade moderada em esteira rolante (12, 33).

4.5. Ca^{2+} intracelular transiente

Os miócitos do VD de ratos sedentários com falha cardíaca (SF) apresentaram, similar à contração celular, amplitude do Ca^{2+} intracelular transiente reduzida (5 e 7 Hz), assim como os tempos para o pico (1, 3, 5 e 7 Hz) e para 50% do decaimento do Ca^{2+} intracelular transiente (1, 3 e 5 Hz) aumentados. Estes resultados indicam os prejuízos causados pela HAP nestes animais, que estão associados à regulação do Ca^{2+} intracelular (12, 33), conforme mencionado acima.

Observou-se também nos miócitos do VD de ratos sedentários com falha cardíaca relação contração-frequência negativa na amplitude do Ca^{2+} intracelular transiente.

Adicionalmente, ratos com falha cardíaca apresentaram menor proporção de células que responderam à frequência de estimulação a 7Hz, comparados aos controles. Conforme mencionado acima, tal relação acompanha a inabilidade destes cardiomiócitos em responder demandas contráteis aumentadas, característica da falha cardíaca (25).

Por outro lado, em animais do grupo EM, os cardiomiócitos apresentaram os parâmetros do Ca^{2+} intracelular transiente semelhantes aos dos grupos controles e a proporção de células que responderam à frequência de 7 Hz foi similar à do grupo controle. Esses resultados são coerentes com os de contratilidade celular e reforçam a proteção do treinamento empregado contra a progressão da HAP. Juntamente com os dados da contratilidade celular, este benefício do exercício reflete a melhor função contrátil dos cardiomiócitos isolados do VD destes animais do grupo EM, se comparados com a daqueles cardiomiócitos isolados dos animais que desenvolveram falha cardíaca. Da mesma forma, possivelmente, o exercício evitou a deterioração de proteínas reguladoras de cálcio nestes animais. De fato, o VD de ratos com HAP induzida por MCT submetidos ao treinamento aeróbico de intensidade moderada em esteira rolante exibiram maior expressão das proteínas SERCA2a e RyR2 (12, 33).

Um resultado inesperado foi que os cardiomiócitos dos animais do grupo EF, apresentaram amplitude do Ca^{2+} intracelular transiente superior aos demais grupos, exceto ao grupo EC (5 Hz). Embora esse resultado seja diferente daqueles apresentados em outros estudos em modelos animais (45, 46) e em humanos com falha cardíaca (47) e ser inconsistente com o resultado de contratilidade celular, observa-se um efeito do exercício nestes animais com falha. No momento, não há explicação para este resultado, o que demanda novas investigações.

Em suma, em pacientes com falha cardíaca do VE, os maiores benefícios do exercício são observados com treinamento intervalado de alta intensidade (48-51). Da mesma forma, em modelos de HAP, foi mostrado que os benefícios do treinamento físico de alta intensidade sobre a hemodinâmica cardíaca e hipertrofia patológica do VD são superiores aos observados com o treinamento contínuo de intensidade moderada (13). De fato, no presente estudo o treinamento físico em corrida voluntária retardou os prejuízos provocados pela HAP na quantidade de cardiomiócitos e de matriz extracelular no VD. Além disso, o exercício empregado aqui protegeu os miócitos do VD contra os prejuízos da HAP na contratilidade celular e no Ca^{2+} intracelular transiente. Assim, acredita-se que as melhoras causadas pelo exercício nos parâmetros teciduais e celulares aqui apresentados, estejam associadas ao

restabelecimento da resistência da artéria pulmonar nos animais com HAP exercitados, o que possibilitou a diminuição da sobrecarga no VD e a atenuação do seu remodelamento adverso. Desta forma, embora não tenha sido avaliada a função do VD, acredita-se que a melhora na tolerância ao exercício e o aumento da sobrevivência nos animais com HAP exercitados sejam mediadas pela melhora na estrutura tecidual do VD, na função contrátil celular e na diminuição da hipertrofia patológica, o que reflete positivamente na função do VD.

5. Conclusões

Concluiu-se que o treinamento em corrida voluntária promove benefícios à estrutura tecidual do VD, assim como à contratilidade e ao Ca^{2+} intracelular transiente em miócitos isolados do VD de ratos com HAP induzida por MCT. Estas melhoras indicam contribuição positiva do exercício físico voluntário na tolerância ao esforço físico e para retardar o desenvolvimento da falha cardíaca nestes animais. Estes achados proporcionam um melhor entendimento sobre as contribuições do exercício físico para a saúde do miocárdio de pacientes com HAP.

6. Referências

1. Ryan JJ, Huston J, Kutty S, Hatton ND, Bowman L, Tian L, et al. Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension. *The Canadian journal of cardiology*. 2015 Apr;31(4):391-406. PubMed PMID: 25840092. Pubmed Central PMCID: PMC4385216. Epub 2015/04/04. eng.
2. Gu S, Hu H, Dong H. Systematic Review of the Economic Burden of Pulmonary Arterial Hypertension. *Pharmacoeconomics*. 2016 Jun;34(6):533-50. PubMed PMID: 26714685. Epub 2015/12/31. eng.
3. Lajoie AC, Bonnet S, Provencher S. Combination therapy in pulmonary arterial hypertension: recent accomplishments and future challenges. *Pulm Circ*. 2017 Apr-Jun;7(2):312-25. PubMed PMID: 28597774. Pubmed Central PMCID: PMC5467950. Epub 2017/06/10. eng.
4. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Respir J*. 2015 Oct;46(4):903-75. PubMed PMID: 26318161. Epub 2015/09/01. eng.
5. Handoko ML, de Man FS, Allaart CP, Paulus WJ, Westerhof N, Vonk-Noordegraaf A. Perspectives on novel therapeutic strategies for right heart failure in pulmonary arterial hypertension: lessons from the left heart. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*. 2010 Mar;19(115):72-82. PubMed PMID: 20956170. Epub 2010/10/20. eng.
6. Pedersen BK, Saltin B. Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2015 Dec;25 Suppl 3:1-72. PubMed PMID: 26606383. Epub 2015/11/26. eng.
7. Dalla Vecchia LA, Bussotti M. Exercise training in pulmonary arterial hypertension. *Journal of thoracic disease*. 2018 01/01/received01/17/accepted;10(1):508-21. PubMed PMID: PMC5863136.
8. Weinstein AA, Chin LM, Keyser RE, Kennedy M, Nathan SD, Woolstenhulme JG, et al. Effect of aerobic exercise training on fatigue and physical activity in patients with pulmonary arterial hypertension. *Respir Med*. 2013 May;107(5):778-84. PubMed PMID: 23478192. Pubmed Central PMCID: PMC3752591. Epub 2013/03/13. eng.
9. Yuan P, Yuan XT, Sun XY, Pudasaini B, Liu JM, Hu QH. Exercise training for pulmonary hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol*. 2015 Jan 15;178:142-6. PubMed PMID: 25464238. Epub 2014/12/03. eng.
10. Arena R, Cahalin LP, Borghi-Silva A, Myers J. The effect of exercise training on the pulmonary arterial system in patients with pulmonary hypertension. *Progress in cardiovascular diseases*. 2015 Mar-Apr;57(5):480-8. PubMed PMID: 25782656. Epub 2015/03/19. eng.
11. Natali AJ, Fowler ED, Calaghan SC, White E. Voluntary exercise delays heart failure onset in rats with pulmonary artery hypertension. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2015 Aug 1;309(3):H421-4. PubMed PMID: 26001413. Epub 2015/05/24. eng.
12. Moreira-Goncalves D, Ferreira R, Fonseca H, Padrao AI, Moreno N, Silva AF, et al. Cardioprotective effects of early and late aerobic exercise training in experimental pulmonary arterial hypertension. *Basic Res Cardiol*. 2015 Nov;110(6):57. PubMed PMID: 26463598. Epub 2015/10/16. eng.
13. Brown MB, Neves E, Long G, Graber J, Gladish B, Wiseman A, et al. High-intensity interval training, but not continuous training, reverses right ventricular hypertrophy and dysfunction in a rat model of pulmonary hypertension. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2017 Feb 1;312(2):R197-R210. PubMed PMID: 27784688. Pubmed Central PMCID: PMC5504398. Epub 2016/10/28. eng.
14. Babu AS, Padmakumar R, Maiya AG, Mohapatra AK, Kamath RL. Effects of Exercise Training on Exercise Capacity in Pulmonary Arterial Hypertension: A Systematic Review of Clinical Trials. *Heart, Lung and Circulation*. 2016;25(4):333-41.
15. Buys R, Avila A, Cornelissen VA. Exercise training improves physical fitness in patients with pulmonary arterial hypertension: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. *BMC*

- Pulm Med. 2015 Apr 22;15:40. PubMed PMID: 25896259. Pubmed Central PMCID: PMC4423624. Epub 2015/04/22. eng.
16. Soares LL, Drummond FR, Lavorato VN, Carneiro-Junior MA, Natali AJ. Exercise training and pulmonary arterial hypertension: A review of the cardiac benefits. *Science & Sports*. 2018 2018/04/17/.
 17. Ryan JJ, Archer SL. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circ Res*. 2014 Jun 20;115(1):176-88. PubMed PMID: 24951766. Pubmed Central PMCID: PMC4112290. Epub 2014/06/22. eng.
 18. Nogueira-Ferreira R, Moreira-Gonçalves D, Santos M, Trindade F, Ferreira R, Henriques-Coelho T. Mechanisms underlying the impact of exercise training in pulmonary arterial hypertension. *Respiratory Medicine*. 2018 2018/01/01;134:70-8.
 19. Kusakari Y, Urashima T, Shimura D, Amemiya E, Miyasaka G, Yokota S, et al. Impairment of Excitation-Contraction Coupling in Right Ventricular Hypertrophied Muscle with Fibrosis Induced by Pulmonary Artery Banding. *PLoS ONE*. 2017 01/0905/31/received11/28/accepted;12(1):e0169564. PubMed PMID: PMC5222608.
 20. Fowler ED, Benoist D, Drinkhill MJ, Stones R, Helmes M, Wüst RCI, et al. Decreased creatine kinase is linked to diastolic dysfunction in rats with right heart failure induced by pulmonary artery hypertension. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015;86:1-8.
 21. Fowler ED, Drinkhill MJ, Norman R, Pervolaraki E, Stones R, Steer E, et al. Beta1-adrenoceptor antagonist, metoprolol attenuates cardiac myocyte Ca(2+) handling dysfunction in rats with pulmonary artery hypertension. *J Mol Cell Cardiol*. 2018 Jul;120:74-83. PubMed PMID: 29807024. Epub 2018/05/29. eng.
 22. Eisner DA, Caldwell JL, Kistamás K, Trafford AW. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circulation Research*. 2017;121(2):181-95.
 23. Mayourian J, Ceholski DK, Gonzalez DM, Cashman TJ, Sahoo S, Hajjar RJ, et al. Physiologic, Pathologic, and Therapeutic Paracrine Modulation of Cardiac Excitation-Contraction Coupling. *Circ Res*. 2018 Jan 5;122(1):167-83. PubMed PMID: 29301848. Pubmed Central PMCID: PMC5886757. Epub 2018/01/06. eng.
 24. Benoist D, Stones R, Drinkhill MJ, Benson AP, Yang Z, Cassan C, et al. Cardiac arrhythmia mechanisms in rats with heart failure induced by pulmonary hypertension. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012 Jun 1;302(11):H2381-95. PubMed PMID: 22427523. Pubmed Central PMCID: PMC3378302. Epub 2012/03/20. eng.
 25. Fowler ED, Benoist D, Drinkhill MJ, Stones R, Helmes M, Wust RC, et al. Decreased creatine kinase is linked to diastolic dysfunction in rats with right heart failure induced by pulmonary artery hypertension. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 Sep;86:1-8. PubMed PMID: 26116865. Pubmed Central PMCID: PMC4564291. Epub 2015/06/28. eng.
 26. Benoist D, Stones R, Benson AP, Fowler ED, Drinkhill MJ, Hardy ME, et al. Systems approach to the study of stretch and arrhythmias in right ventricular failure induced in rats by monocrotaline. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2014 Aug;115(2-3):162-72. PubMed PMID: 25016242. Pubmed Central PMCID: PMC4210667. Epub 2014/07/13. eng.
 27. Carneiro-Júnior MA, Quintão-Júnior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, da Cunha DNQ, et al. The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2013 2013/04/01;57:119-28.
 28. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. 1978 Dec;58(6):1072-83. PubMed PMID: 709763. Epub 1978/12/01. eng.
 29. Wang Z, Patel JR, Schreier DA, Hacker TA, Moss RL, Chesler NC. Organ-level right ventricular dysfunction with preserved Frank-Starling mechanism in a mouse model of pulmonary arterial hypertension. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2018 May 1;124(5):1244-53. PubMed PMID: 29369739. Epub 2018/01/26. eng.

30. Natali AJ, Turner DL, Harrison SM, White E. Regional effects of voluntary exercise on cell size and contraction-frequency responses in rat cardiac myocytes. *The Journal of experimental biology*. 2001 Mar;204(Pt 6):1191-9. PubMed PMID: 11222134. Epub 2001/02/27. eng.
31. Kondo RP, Dederko DA, Teutsch C, Chrast J, Catalucci D, Chien KR, et al. Comparison of contraction and calcium handling between right and left ventricular myocytes from adult mouse heart: a role for repolarization waveform. *The Journal of physiology*. 2006 12/1511/04/received12/09/accepted;571(Pt 1):131-46. PubMed PMID: PMC1805641.
32. Nogueira-Ferreira R, Moreira-Goncalves D, Silva AF, Duarte JA, Leite-Moreira A, Ferreira R, et al. Exercise preconditioning prevents MCT-induced right ventricle remodeling through the regulation of TNF superfamily cytokines. *Int J Cardiol*. 2016 Jan 15;203:858-66. PubMed PMID: 26599752. Epub 2015/11/26. eng.
33. Pacagnelli FL, de Almeida Sabela AK, Okoshi K, Mariano TB, Campos DH, Carvalho RF, et al. Preventive aerobic training exerts a cardioprotective effect on rats treated with monocrotaline. *Int J Exp Pathol*. 2016 Jun;97(3):238-47. PubMed PMID: 27365256. Pubmed Central PMCID: PMC4960574. Epub 2016/07/02. eng.
34. Souza-Rabbo MP, Silva LF, Auzani JA, Picoral M, Khaper N, Bello-Klein A. Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008 Aug;35(8):944-8. PubMed PMID: 18430062. Epub 2008/04/24. eng.
35. Crosswhite P, Sun Z. Molecular mechanisms of pulmonary arterial remodeling. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2014 Apr 22;20:191-201. PubMed PMID: 24676136. Pubmed Central PMCID: PMC4002851. Epub 2014/03/29. eng.
36. Colombo R, Siqueira R, Conzatti A, Fernandes TR, Tavares AM, Araujo AS, et al. Aerobic Exercise Promotes a Decrease in Right Ventricle Apoptotic Proteins in Experimental Cor Pulmonale. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015 Sep;66(3):246-53. PubMed PMID: 25923321. Epub 2015/04/30. eng.
37. Ashor AW, Lara J, Siervo M, Celis-Morales C, Oggioni C, Jakovljevic DG, et al. Exercise modalities and endothelial function: a systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *Sports medicine (Auckland, NZ)*. 2015 Feb;45(2):279-96. PubMed PMID: 25281334. Epub 2014/10/05. eng.
38. Balligand JL, Feron O, Dessy C. eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiological reviews*. 2009 Apr;89(2):481-534. PubMed PMID: 19342613. Epub 2009/04/04. eng.
39. Hallmark R, Patrie JT, Liu Z, Gaesser GA, Barrett EJ, Weltman A. The effect of exercise intensity on endothelial function in physically inactive lean and obese adults. *PLoS One*. 2014;9(1):e85450. PubMed PMID: 24465565. Pubmed Central PMCID: PMC3896361. Epub 2014/01/28. eng.
40. Tjonna AE, Rognmo O, Bye A, Stolen TO, Wisloff U. Time course of endothelial adaptation after acute and chronic exercise in patients with metabolic syndrome. *Journal of strength and conditioning research*. 2011 Sep;25(9):2552-8. PubMed PMID: 21747296. Epub 2011/07/13. eng.
41. Mereles D, Ehlken N, Kreuscher S, Ghofrani S, Hoeper MM, Halank M, et al. Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Circulation*. 2006 Oct 3;114(14):1482-9. PubMed PMID: 16982941. Epub 2006/09/20. eng.
42. Ley S, Fink C, Risse F, Ehlken N, Fischer C, Ley-Zaporozhan J, et al. Magnetic resonance imaging to assess the effect of exercise training on pulmonary perfusion and blood flow in patients with pulmonary hypertension. *European radiology*. 2013 Feb;23(2):324-31. PubMed PMID: 22886553. Epub 2012/08/14. eng.
43. Rain S, Handoko ML, Trip P, Gan CT, Westerhof N, Stienen GJ, et al. Right ventricular diastolic impairment in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2013 Oct 29;128(18):2016-25. PubMed PMID: 24056688. Epub 2013/09/24. eng.
44. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198-205.
45. Gomez JF, Cardona K, Romero L, Ferrero JM, Jr., Trenor B. Electrophysiological and structural remodeling in heart failure modulate arrhythmogenesis. 1D simulation study. *PLoS One*.

- 2014;9(9):e106602. PubMed PMID: 25191998. Pubmed Central PMCID: PMC4156355. Epub 2014/09/06. eng.
46. Luo M, Anderson ME. Mechanisms of altered Ca²(+) handling in heart failure. *Circ Res*. 2013 Aug 30;113(6):690-708. PubMed PMID: 23989713. Pubmed Central PMCID: PMC4080816. Epub 2013/08/31. eng.
 47. Piacentino V, 3rd, Weber CR, Chen X, Weisser-Thomas J, Margulies KB, Bers DM, et al. Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res*. 2003 Apr 4;92(6):651-8. PubMed PMID: 12600875. Epub 2003/02/26. eng.
 48. Wisloff U, Stoylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognmo O, Haram PM, et al. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study. *Circulation*. 2007 Jun 19;115(24):3086-94. PubMed PMID: 17548726. Epub 2007/06/06. eng.
 49. Haykowsky MJ, Timmons MP, Kruger C, McNeely M, Taylor DA, Clark AM. Meta-Analysis of Aerobic Interval Training on Exercise Capacity and Systolic Function in Patients With Heart Failure and Reduced Ejection Fractions. *American Journal of Cardiology*. 2013;111(10):1466-9.
 50. Ulbrich AZ, Angarten VG, Schmitt Netto A, Sties SW, Bündchen DC, Mara LSd, et al. Comparative effects of high intensity interval training versus moderate intensity continuous training on quality of life in patients with heart failure: Study protocol for a randomized controlled trial. *Clinical Trials and Regulatory Science in Cardiology*. 2016 2016/01/01;13:21-8.
 51. Ellingsen O, Halle M, Conraads V, Stoylen A, Dalen H, Delagardelle C, et al. High-Intensity Interval Training in Patients With Heart Failure With Reduced Ejection Fraction. *Circulation*. 2017 Feb 28;135(9):839-49. PubMed PMID: 28082387. Pubmed Central PMCID: PMC5325251. Epub 2017/01/14. eng.

7. Anexo 1- Parecer de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais UFV

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 81/2016, intitulado **“Efeitos do exercício físico sobre funções cardíacas em modelo de hipertensão arterial pulmonar”**, coordenado pelo professor Antônio José Natali do Departamento de Educação Física, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 16/12/2016, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 81/2016, named **“Effects of exercise on cardiac function in a model of pulmonary arterial hypertension”**, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on December 16, 2016 valid for 12 months.


Prof. Átina Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

8. Anexo 2- Primeira página do artigo publicado (capítulo 1)

+Model
SCISPO-3206; No. of Pages 10

ARTICLE IN PRESS

Science & Sports (2018) xxx, xxx–xxx



Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



BASIC STUDY

Exercise training and pulmonary arterial hypertension: A review of the cardiac benefits

Entraînement physique et hypertension artérielle pulmonaire : un examen des avantages cardiaques

L.L. Soares^a, F.R. Drummond^b, V.N. Lavorato^c,
M.A. Carneiro-Junior^a, A.J. Natali^{a,*}

^a Laboratory of exercise biology, department of physical education, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil

^b Department of general biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil

^c Department of biological sciences, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil

Received 12 December 2017; accepted 28 February 2018

KEYWORDS

Physical activity;
Cardiac remodeling;
Pulmonary
circulation;
Heart diseases

Summary

Aims. — Patients of pulmonary arterial hypertension (PAH) exhibit reduced functional capacity and exercise tolerance. Despite the evidences that exercise training is beneficial to this population, it is still being tested whether regular physical exercise can mitigate the complications of PAH. The aim of this review was to point out the cardiac functional and structural adaptations to exercise training in animal models of PAH, and highlight the cellular and molecular mechanisms underlying the benefits of exercise to individuals with PAH.

News. — A systematic review of original articles published in PubMed and ScienceDirect databases was conducted by two independent researchers. Relevant information on animal model, exercise protocol, cardiac functional and structural adaptations was extracted and discussed. The results show that in rats with monocrotaline-induced PAH (50–60 mg/kg body weight), the predominant model used, aerobic continuous (treadmill running) and intermittent (voluntary wheel running) exercise training of moderate intensity, performed either prior or during the development of PAH, promote benefits to the myocardium. Moreover, the articles reveal that the cardiac function (i.e. restoration of right ventricle systolic and diastolic pressure, AT/ET ratio, TAPSE and cardiomyocyte contractility) and structure (i.e. reduced hypertrophy and fibrosis; improved profile of proteins related to cellular contraction and inflammatory response) are

* Corresponding author at: Department of physical education, avenue Peter Henry Rolfs, s/n, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa-MG, Brasil.

E-mail address: ajnatali@ufv.br (A.J. Natali).

<https://doi.org/10.1016/j.scispo.2018.02.012>

0765-1597/© 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Soares LL, et al. Exercise training and pulmonary arterial hypertension: A review of the cardiac benefits. Sci sports (2018), <https://doi.org/10.1016/j.scispo.2018.02.012>