

**LUCIANO BERNARDES LEITE**

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO COMBINADO SOBRE A MORFOLOGIA E A  
FUNÇÃO CARDIOPULMONAR EM RATOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL  
PULMONAR**

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*.

Orientador: Antônio José Natali

Coorientadores: Emily Correna Carlo Reis  
Miguel Araújo Carneiro Júnior

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

L533e  
2022  
Leite, Luciano Bernardes, 1995-  
Efeitos do treinamento físico combinado sobre a morfologia  
e a função cardiopulmonar em ratos com hipertensão arterial  
pulmonar. / Luciano Bernardes Leite. – Viçosa, MG, 2022.  
1 dissertação eletrônica (73 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Orientador: Antônio José Natali.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Educação Física, 2022.

Referências bibliográficas: f. 65-72.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.546>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Aptidão física - Testes. 2. Hipertensão pulmonar.  
3. Monocrotalina. 4. Ratos como animais de laboratório.  
I. Natali, Antônio José, 1961-. II. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Educação Física. Mestrado em  
Educação Física. III. Título.

CDD 22. ed. 613.7

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317

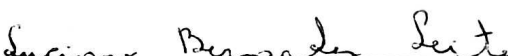
**LUCIANO BERNARDES LEITE**

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO COMBINADO SOBRE A MORFOLOGIA E A  
FUNÇÃO CARDIOPULMONAR EM RATOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL  
PULMONAR**

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: 20 de julho de 2022.

Assentimento:

  
\_\_\_\_\_  
Luciano Bernardes Leite  
Autor

  
\_\_\_\_\_  
Antônio José Natali  
Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

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

Aos meus pais Maria Aparecida e Vanil (In Memoriam), a minha irmã Fátima e as minhas sobrinhas Izabela e Maria Eduarda, a base para minhas conquistas, por todo amor, sinceridade, companheirismo e por sempre entendermos as minhas ausências.

À minha namorada Bruna pelo amor, paciência, companheirismo, conselhos e constante apoio 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.

Ao meu grande amigo Leôncio Soares, pela amizade construída ao longo desses anos e pelo acompanhamento constante durante todo o processo da construção e finalização desse trabalho.

Aos meus amigos Luiz Eduardo, Luis Henriques, Ystheilon Pereira, Bruno Coelho 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 meu coorientador professor Miguel Araújo Carneiro Junior, aos amigos do Laboratório de Biologia do Exercício (Leonardo, Alexandre, Victor, Anselmo, Bruna, Tais, Thayane, Meilene e Andres) e amigos da turma da pós-graduação pelos conselhos, trocas de experiências e momentos de diversão.

Ao meu professor Guilherme de Azambuja Pussieldi, que foi quem abriu a primeira porta acadêmica ainda em Florestal, obrigado por sempre confiar em mim, me apoiar e ser meu amigo.

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

À professora Mariana Machado Neves e ao Luiz Otávio, pela possibilidade e ajuda durante a realização das análises histológicas;

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 membros da Banca, por aceitarem o convite e pela participação;

Aos animais experimentais, que merecem todo o respeito. À UFV, pela oportunidade de realização de mais uma etapa de minha vida.

*“O único lugar aonde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”.*

(Albert Einstein)

## RESUMO

LEITE, Luciano Bernardes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2022. **Efeitos do treinamento físico combinado sobre a morfologia e a função cardiopulmonar em ratos com hipertensão arterial pulmonar.** Orientador: Antônio José Natali. Coorientadores: Emily Correna Carlo Reis e Miguel Araújo Carneiro Júnior.

**Objetivo:** Investigar os efeitos do treinamento físico combinado de intensidade moderada, durante o desenvolvimento da hipertensão arterial pulmonar (HAP) induzida por monocrotalina (MCT), sobre a morfologia e a função cardiopulmonar em ratos. **Metodologia:** Ratos Wistar (idade: ~ 2 meses; massa corporal: ~200g) foram divididos em dois grupos de 7 animais cada, para avaliar a sobrevivência: Sedentário Hipertenso Sobrevivência (SHS); e Exercício Hipertenso Sobrevivência (EHS). Outros ratos Wistar da mesma idade e peso foram divididos em três grupos de 14 animais cada, para avaliar as demais variáveis: Sedentário Controle (SC); Sedentário Hipertenso (SH) e Exercício Hipertenso (EH). Os ratos dos grupos SHS, SH e EH receberam uma injeção intraperitoneal (60 mg/kg) de MCT, enquanto os do grupo SC receberam o mesmo volume de solução salina. Todos os ratos foram testados para a velocidade máxima de corrida (VMC) em esteira e a carga máxima carregada (CMC) durante a escalada antes do início do experimento, aos 12 e 14 dias após a injeção de MCT, respectivamente, assim como no final do protocolo experimental (19 e 21 dias após injeção de MCT, respectivamente). A avaliação ecocardiográfica foi realizada no 22º dia após a aplicação de MCT. Os animais dos grupos EHS e EH foram submetidos a um programa de treinamento físico combinado: exercício aeróbico [corrida em esteira (60 min/dia; 60% da velocidade máxima de corrida)]; e exercício resistido [escalada em escada vertical (15 escaladas; 60% da carga máxima)], em dias alternados, 5 dias/semana (segunda a sexta-feira), por aproximadamente 4 semanas. Os ratos dos grupos SHS e EHS chegaram ao óbito com o desenvolvimento da HAP. A eutanásia dos animais dos grupos SC, SH e EH foi realizada na mediana de sobrevivência dos ratos do grupo SHS (23º dia após injeção de MCT). Após a eutanásia, o coração e os pulmões foram removidos, pesados e processados para as análises de interesse. Nos tecidos do ventrículo direito (VD) e pulmão direito foram realizadas análises histomorfométricas. Em miócitos isolados do VD foram analisadas a contração e o  $Ca^{2+}$  intracelular transiente. **Resultados:** Os ratos do grupo EHS

tiveram mediana de sobrevivência maior (29 dias) que os do grupo SHF (23 dias;  $p < 0,05$ ). O treinamento combinado aumentou a tolerância ao esforço físico (TTF: 27,6%; CMC relativa: 24,3%). A HAP aumentou a resistência da artéria pulmonar (redução da TA/TE) e reduziu a função do VD (redução da TAPSE). Por outro lado, o treinamento físico combinado preveniu o aumento da resistência da artéria pulmonar e a redução da função do VD. Em nível tecidual, a HAP aumentou a massa do coração, do VD e o percentual de colágeno. Porém, o treinamento físico combinado reduziu a massa do VD e o percentual de colágeno. No pulmão direito, a HAP aumentou o percentual de septo alveolar e reduziu o percentual de alvéolos pulmonares. Contudo, o treinamento físico combinado preveniu a redução do percentual de alvéolos pulmonares e o aumento do percentual septo alveolar. Em miócitos isolados do VD, a HAP reduziu a amplitude de contração e a velocidade de contração e relaxamento. Todavia, o treinamento físico combinado preveniu a redução da amplitude de contração e das velocidades de contração e relaxamento. Ademais, a HAP reduziu a amplitude e as velocidades até o pico e de decaimento do  $Ca^{2+}$  intracelular transiente. Entretanto, o treinamento físico combinado preveniu a redução da amplitude e das velocidades até o pico e de decaimento do  $Ca^{2+}$  intracelular transiente. **Conclusão:** O protocolo de treinamento físico combinado aplicado previne o aumento da resistência da artéria pulmonar, a disfunção sistólica do VD e o remodelamento adverso do VD e do pulmão direito, além de promover benefícios na contração e no  $Ca^{2+}$  intracelular transiente de miócitos isolados do VD em ratos com HAP induzida por MCT. Juntos, estes benefícios contribuem para melhorar a tolerância ao esforço físico e a sobrevivência destes ratos.

**Palavras-chave:** Treinamento físico combinado. Hipertensão pulmonar. MCT. Miócitos isolados. Contração. TAPSE.

## ABSTRACT

LEITE, Luciano Bernardes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2022. **Effects of combined physical training on morphology and cardiopulmonary function in rats with pulmonary arterial hypertension.** Advisor: Antonio José Natali. Co-advisors: Emily Correna Carlo Reis and Miguel Araújo Carneiro Júnior.

**Objective:** To investigate the effects of moderate-intensity combined physical training, during the development of monocrotaline (MCT)-induced pulmonary arterial hypertension (PAH), on morphology and cardiopulmonary function in rats.

**Methodology:** Wistar rats (age: ~2 months; body mass: ~200g) were divided into two groups of 7 animals each, to assess survival: Sedentary Hypertensive Survival (SHS); and Exercise Hypertensive Survival (EHS). Other Wistar rats of the same age and weight were divided into three groups of 14 animals each, to evaluate the other variables: Sedentary Control (SC); Hypertensive Sedentary (SH) and Hypertensive Exercise (HE). Rats in the SHS, SH and EH groups received an intraperitoneal injection (60 mg/kg) of MCT, while those in the SC group received the same volume of saline. All rats were tested for maximum running speed (VMC) on a treadmill and maximum carrying load (CMC) during climbing before the start of the experiment, and at 12 and 14 days after MCT injection, respectively, as well as at the end of the experimental protocol (19 and 21 days after MCT injection, respectively). Echocardiographic evaluation was performed on the 22<sup>nd</sup> day after MCT application. The animals in the EHS and EH groups underwent a combined physical training program: aerobic exercise [Treadmill running (60 min/day; 60% of maximum running speed)]; and resistance exercise [Vertical ladder climbing (15 climbs; 60% of maximum carrying load)], every other day, 5 days/week (Monday to Friday), for approximately 4 weeks. Rats in the SHS and EHS groups died with the development of PAH. The euthanasia of the animals in the SC, SH and EH groups was performed at the median survival rate of the rats in the SHS group (23<sup>rd</sup> day after MCT injection). Histomorphometric analyzes were performed on the right ventricle (RV) and right lung tissues. Cell contraction and intracellular Ca<sup>2+</sup> transient were analyzed in isolated RV myocytes. **Results:** Rats in the EHS group had longer survival (29 days) than those in the SHF group (23 days;  $p < 0.05$ ). Combined physical training increased physical effort tolerance (TTF: 27.6%; relative CMC: 24.3%). PAH increased pulmonary artery

resistance (TA/TE reduction) and reduced RV function (TAPSE reduction). On the other hand, combined physical training prevented the increase in pulmonary artery resistance and the reduction in RV function. At the tissue level, PAH increased heart and RV mass and collagen percentage. However, combined physical training reduced RV mass and collagen percentage. In the right lung, PAH increased the percentage of alveolar septum and reduced the percentage of pulmonary alveoli. Nevertheless, combined physical training prevented the reduction in the percentage of pulmonary alveoli and the increase in the percentage of alveolar septum. In isolated RV myocytes, PAH reduced the contraction amplitude and the contraction and relaxation velocities. Nonetheless, combined physical training prevented the reduction in contraction amplitude and contraction and relaxation velocities. Furthermore, PAH reduced the amplitude and velocities to peak and decay of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  transient. However, the combined physical training prevented the reduction in the amplitude and velocities to peak and decay of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  transient. **Conclusion:** The combined physical training protocol applied prevents increases in pulmonary artery resistance, RV systolic dysfunction and adverse remodeling of the RV and right lung, in addition to promotes benefits to contraction and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  transient in isolated RV myocytes in mice with MCT-induced PAH. Together, these benefits contribute to improve physical effort tolerance and survival in these rats.

**Keywords:** Combined physical training. Pulmonary hypertension. MCT. myocytes isolated. Contraction. TAPSE.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Desenho experimental.....	27
<b>Figura 2.</b> Esteira ergométrica para ratos. ....	28
<b>Figura 3.</b> Escada vertical. ....	29
<b>Figura 4.</b> Representação das dimensões de cardiomiócito do VD.. ....	34
<b>Figura 5.</b> Traçado representativo da contração celular .....	35
<b>Figura 6.</b> Traçado representativo do $Ca^{2+}$ intracelular transiente. ....	37
<b>Figura 7.</b> Sobrevivência de animais com hipertensão arterial pulmonar. ....	39
<b>Figura 8.</b> Tolerância esforço físico.....	41
<b>Figura 9.</b> Resistência da artéria pulmonar.....	43
<b>Figura 10.</b> Função sistólica do ventrículo direito.....	44
<b>Figura 11.</b> Contratilidade de miócitos isolados do ventrículo direito.....	45
<b>Figura 12.</b> $Ca^{2+}$ intracelular transiente em miócitos isolado do ventrículo direito.. ...	46
<b>Figura 13.</b> Área de secção transversa de miócitos do ventrículo direito.....	47
<b>Figura 14.</b> Dimensões de miócitos do ventrículo direito.. ....	48
<b>Figura 15.</b> Fotomicrografias representativas do ventrículo direito.. ....	50
<b>Figura 16.</b> Histomorfometria do pulmão direito.....	51

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Peso corporal, peso dos órgãos e suas razões. ....	42
<b>Tabela 2.</b> Proporção histomorfométrica entre os elementos teciduais do ventrículo direito. ....	49

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Akt: proteína quinase B  
ANOVA: análise de variância  
AST: área de secção transversa  
ATPase: enzima que catalisa a hidrólise do ATP para produção de energia  
Ca<sup>2+</sup>: íon cálcio  
CaCl<sub>2</sub>: cloreto de cálcio  
CEUA-UFV: Comissão de Ética no Uso de Animais  
CMC: carga máxima carregada  
CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono  
DC: débito cardíaco  
DMSO: dimetilsulfóxido de dimetilo  
DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica  
EGTA: ácido tetracético etilenoglicol  
EH: exercício hipertenso  
EHS: sedentário hipertenso sobrevivência  
EUA: Estados Unidos da América  
eNOS: óxido nítrico sintase endotelial  
EPM: erro padrão da média  
ET-1: endotelina 1  
HAP: hipertensão arterial pulmonar  
HEPES: ácido etanosulfônico-hidroxietil piperazina  
Hz: hertz (frequência)  
HP: hipertensão pulmonar  
KCl: cloreto de potássio  
MCT: monocrotalina  
MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio  
mg/mm: razão miligrama por milímetros  
miRNA: microRNA  
mmHg: milímetros de mercúrio  
MMP: metaloproteinases de matriz  
mTOR: alvo da rapamicina em mamíferos Na<sup>+</sup>: íon sódio  
NaCl: cloreto de sódio

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: fosfato monosódico  
ON: óxido nítrico  
PCor: peso do coração  
PC: peso corporal  
PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase  
PLB: fosfolambam  
PPD: peso do pulmão direito  
RS: retículo sarcoplasmático  
PV: peso dos ventrículos  
PVD: peso do ventrículo direito  
RVP: resistência vascular pulmonar  
RyR2: canais receptores de rianodina do tipo 2  
SC: sedentário controle  
SERCA2a: isoforma cardíaca da Ca<sup>2+</sup> ATPase do retículo sarcoplasmático  
SH: sedentário hipertenso  
SHR: rato espontaneamente hipertenso  
SHS: sedentário hipertenso sobrevivência  
TA: tempo de aceleração do fluxo na artéria pulmonar  
TA/TE: razão tempo de aceleração pelo tempo de ejeção  
TAPSE: excursão sistólica do plano anular tricúspide  
TE: tempo de ejeção  
TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa  
TTF: tempo total até a fadiga  
UFV: Universidade Federal de Viçosa  
VD: ventrículo direito  
VD/VE: razão peso do ventrículo direito pelo ventrículo esquerdo  
VEGF: fator de crescimento endotelial vascular  
VMC: velocidade máxima de corrida  
VSF: volume sistólico final

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1. Epidemiologia da hipertensão arterial pulmonar .....	17
1.2. Modelo de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina .....	19
1.3. Tratamento da hipertensão arterial pulmonar .....	21
2. OBJETIVOS .....	25
2.1. Geral .....	25
2.2. Específicos .....	25
3. HIPÓTESES .....	25
4. METODOLOGIA .....	26
4.1. Animais e desenho experimental .....	26
4.2. Indução da hipertensão arterial pulmonar .....	27
4.3. Protocolo de treinamento físico combinado .....	27
4.3.1. Teste de velocidade máxima de corrida .....	28
4.3.2. Treinamento físico aeróbico .....	29
4.3.3. Teste de carga máxima carregada .....	29
4.3.4. Treinamento físico resistido .....	30
4.4. Ecocardiografia .....	31
4.5. Coleta de amostras .....	31
4.6. Análises histológicas e morfometria do ventrículo direito e pulmão .....	32
4.6.1. Histomorfometria do ventrículo direito .....	32
4.6.2. Histomorfometria do pulmão direito .....	33
4.7. Isolamento dos cardiomiócitos .....	33
4.8. Mensuração do comprimento e largura celular .....	34
4.9. Mensuração da contratilidade celular .....	35
4.10. Mensuração do $Ca^{2+}$ intracelular transiente .....	36
4.11. Composição das soluções .....	37
4.11.1. Soluções de isolamento .....	37
4.11.2. Solução de perfusão-tampão hepes .....	38
4.12. Análise estatística .....	38
5. RESULTADOS .....	39
5.1. Sobrevivência e peso corporal .....	39

5.2. Tolerância ao esforço físico.....	40
5.3. Peso corporal, peso dos órgãos e suas razões.....	42
5.4. Resistência da artéria pulmonar.....	43
5.5. Função do ventrículo direito .....	44
5.6. Contratilidade celular.....	45
5.7. Ca <sup>2+</sup> intracelular transiente.....	46
5.8. Dimensões dos miócitos do ventrículo direito .....	46
5.8.1. Área de secção transversa.....	46
5.8.2. Dimensões de miócitos isolados do ventrículo direito .....	47
5.9. Proporções histomorfométricas entre os elementos teciduais do ventrículo direito .....	49
5.10. Proporções histomorfométricas do pulmão direito .....	51
6. DISCUSSÃO.....	52
6.1. Sobrevivência e tolerância ao esforço físico .....	52
6.2. Peso corporal, dos órgãos e morfometria do ventrículo direito .....	53
6.3. Hemodinâmica .....	55
6.4. Contratilidade celular e Ca <sup>2+</sup> intracelular transiente .....	57
6.5. Histofometria do ventrículo direito.....	59
6.5.1. Dimensões dos miócitos .....	59
6.5.2. Estruturas celulares e extracelulares do ventrículo direito .....	60
6.5.3. Histomorfometria do pulmão direito .....	61
7.CONCLUSÃO .....	64
8.REFERÊNCIAS.....	65
9.ANEXO – CERTIFICADO APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA .....	73

## 1. INTRODUÇÃO

A hipertensão pulmonar (HP) é uma doença rara e multifatorial, responsável por uma elevada taxa de mortalidade devido as diversas complicações cardiovasculares e respiratórias que a mesma pode causar [1]. Atualmente a HP é classificada em 5 categorias, sendo estas divididas de acordo com a sua etiologia clínica. 1) hipertensão arterial pulmonar (HAP); 2) HP associada à doença cardíaca esquerda; 3) HP por doença pulmonar e/ou hipóxia crônica; 4) HP associada à doença trombótica ou embólica; e 5) HP associada a mecanismos multifatoriais [1].

Dentre os tipos de HP, o mais comum é a HAP que é definida como vasculopatia pulmonar, caracterizada por pressão arterial pulmonar média em repouso acima de 25 mmHg e pressão capilar pulmonar menor que 15 mmHg ou pressão diastólica final do ventrículo esquerdo  $\leq 15$  mmHg e da resistência vascular pulmonar (RVP)  $> 3$  unidades Wood medidas por cateterismo cardíaco [2, 3]. Isso ocorre devido ao fluxo sanguíneo restrito na circulação arterial pulmonar, a combinação de disfunção endotelial e aumento da contratilidade das pequenas artérias pulmonares, que são eventos subsequentes 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 por sua vez conduz para aumento da RVP e, em última instância, na falha cardíaca [4, 5].

Dentre as características patológicas que caracterizam a HAP, destacam-se, o remodelamento da artéria pulmonar, inflamação, fibrose, trombose [5]. Além disso, em alguns vasos essas características patológicas podem levar a obstrução do lúmen do vaso, causando lesões vasculares complexas que são conhecidas como lesões plexiformes, comprometendo assim toda a circulação pulmonar e gerando aumento da RVP [6]. Dessa forma, esse aumento da RVP leva a um aumento da pós carga do ventrículo direito (VD), que de forma crônica desenvolve hipertrofia e dilatação causando uma diminuição do volume sistólico, comprometendo toda função a cardiopulmonar [7].

Os sintomas mais comuns presentes em pacientes com HAP são dispneia e fadiga que afetam a capacidade física e a qualidade de vida dos indivíduos diagnosticados com a doença [8]. Além disso, estudos tem mostrado que a intolerância ao esforço físico também é uma característica da doença e ocorre devido

a redução do débito cardíaco e disfunção respiratória [9]. Porém, estes sintomas são comuns em outras doenças o que na maioria das vezes dificulta um diagnóstico precoce da HAP [10, 11].

Portanto, a HAP é uma doença de diagnóstico complexo e difícil pois necessita de investigações invasivas e uma experiência significativa no processo de avaliação do paciente [12]. Dessa forma, as diretrizes recomendam que o diagnóstico da doença seja realizado por centros especializados no tratamento de doenças pulmonares [12-14]. Atualmente os métodos mais utilizados para diagnóstico da doença são o cateterismo direto e a ecocardiografia transtorácica [12].

O cateterismo direto é um método que avalia a gravidade da insuficiência hemodinâmica e a vasorreatividade da circulação pulmonar, fornecendo assim um diagnóstico definitivo da HAP [15]. Porém, apesar do cateterismo ser um método seguro, ele é invasivo e pouco prático [12]. Dessa forma a ecocardiografia tem se mostrado uma alternativa interessante, prática e eficaz no diagnóstico de pacientes em risco de desenvolvimento da HAP. O método é capaz de fornecer uma avaliação precisa sobre a função cardíaca do indivíduo [12].

Dentre os parâmetros avaliados pelo ecocardiograma que são frequentemente observados em pacientes com HAP estão: dilatação do átrio e ventrículo direito; achatamento do septo interventricular; aumento da resistência da artéria pulmonar (estimado pela razão tempo de aceleração (TA) e ejeção (TE), disfunção ventricular direita e dilatação das veias cavas e hepáticas [16]. Ademais, a excursão sistólica no plano do anel da tricúspide (TAPSE) também é considerada um parâmetro hemodinâmico importante no prognóstico da HAP, ela representa a função do VD [17]. Dessa forma, quando um paciente apresenta disfunção ventricular direita os valores normais da TAPSE estão reduzidos [18].

Desse modo, a ecocardiografia tem se mostrado um método não-invasivo bastante útil clinicamente, pois fornece uma avaliação multidimensional da circulação pulmonar facilitando o diagnóstico precoce da doença [19].

### **1.1. Epidemiologia da hipertensão arterial pulmonar**

Embora seja considerada uma doença rara, as complicações impostas pela HAP aos pacientes e a alta taxa de mortalidade em um curto espaço de tempo desde o seu diagnóstico faz com que essa doença seja um grave problema público de saúde.

Atualmente a HAP possui incidência de 5,8 casos por milhão de pessoas no mundo e prevalência de 15 a 22 casos por milhão de indivíduos [20, 21]. Atualmente no Brasil existem aproximadamente 2 milhões de indivíduos com HAP [20].

Em estudo realizado de 1981 a 1985 pelo *National Institutes of Health* dos Estados Unidos da América (EUA), verificou-se que a idade média de diagnóstico da HAP era de  $36 \pm 15$  anos, enquanto a média de sobrevivência era de 2,8 anos [22]. No estudo realizado por Ogawa et al. [23], observou-se que com o passar dos anos houve um aumento na média de sobrevivência. Pacientes diagnosticados com HAP apresentaram média de sobrevivência de  $14,9 \pm 0,8$  anos com taxas de sobrevivência de 1, 5 e 10 anos de 98%, 96% e 78% respectivamente, no Japão. Esse aumento nas taxas de sobrevivência foi associado à disponibilidade de drogas para tratamento da HAP. Adicionalmente, houve também um aumento na idade média de diagnóstico da doença, chegando a  $65 \pm 15$  anos [24]. No estudo de Kodur et al. [25] constatou-se que pacientes acima de 55 anos diagnosticados com HAP demonstraram um rendimento inferior no teste de caminhada de 6 minutos, um maior risco de hospitalização, necessidade de transporte imediato ou morte. Todas estas mudanças na epidemiologia da HAP, podem ter sido influenciadas por diversos fatores, dentre eles destacam-se: modificações na classificação da doença, melhora no diagnóstico e maior acesso aos tratamentos disponíveis [10].

Em relação aos pacientes diagnosticados com a doença, sabe-se que há uma incidência maior nas mulheres em comparação aos homens, sendo que a razão dessa predominância até o presente momento ainda permanece desconhecida [10, 26]. Ainda, segundo Manes et al., [27], a idade média de diagnóstico da doença é menor em mulheres, por outro lado os homens apresentam maior risco de mortalidade devido a influência dos hormônios sexuais, principalmente o estrogênio, que apesar de favorecer o desenvolvimento da HAP, ele pode diminuir algumas complicações causadas pela doença.

No Brasil, foi feito um levantamento prospectivo de casos incidentes de HAP entre 2008 e 2013, com um total de 178 pacientes diagnosticados com a doença [28]. Observou-se uma média de 46 anos no diagnóstico e uma razão mulheres/homens de 3,3:1. Além disso, a HAP idiopática foi a mais comum encontrada no país (28,7%), seguida da HAP causada por alguma doença do tecido conectivo (25,8%) e esquistossomose (19,7%).

Dessa forma, ressalta-se a necessidade que novos estudos sobre a HAP sejam realizados com o objetivo de melhorar o diagnóstico, entender a fisiopatologia da doença e conseqüentemente melhorar o tratamento da mesma. Quanto a fisiopatologia da doença, ao longo dos anos a utilização de modelos animais na HAP têm contribuído de forma significativa para o entendimento dos diversos prejuízos causados pela doença e os possíveis tratamentos experimentais que podem promover benefícios neste público [29].

## **1.2. Modelo de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina**

O modelo animal de HAP induzida por MCT é um dos mais utilizados por diversos pesquisadores em todo mundo devido à sua simplicidade técnica, facilidade de reprodução dos experimentos e o baixo custo em comparação a outros modelos [30, 31]. Além disso, este modelo também é capaz de mimetizar a HAP humana, devido as características desenvolvidas ao longo da doença como: remodelamento vascular, proliferação de células musculares lisas, disfunção endotelial, aumento da expressão de citocinas inflamatórias e falha do VD [32, 33].

A MCT é um alcaloide pirrolizidínico encontrado nos caules, folhas e sementes de plantas do gênero *Crotalaria* sp [34]. Atualmente, são utilizadas três formas de desenvolvimento da HAP em modelos animais: uma dose de 40 mg/kg, dividida em duas aplicações de 20 mg/kg com um intervalo de 7 dias entre elas; uma única dose de 40 mg/kg; e uma única dose de 60 mg/kg. A dosagem de 60 mg/kg caracteriza uma HAP progressiva severa, pois apresenta um nível elevado de toxicidade, hipertrofia cardíaca patológica e lesão pulmonar aguda [35, 36]. As dosagens de 40 mg/kg são caracterizadas por uma HAP mais estável com preservação principalmente do débito cardíaco [35].

Dentre estes modelos, o mais utilizado ao longo dos anos foi a dosagem de 60 mg/kg de MCT para desenvolvimento da HAP [36]. Sabe-se que nesse modelo inicialmente ocorre um desequilíbrio entre os fatores vasodilatadores e vasoconstritores na vasculatura pulmonar, sendo que há uma diminuição do primeiro em detrimento do segundo [37]. Estudos mostram que ratos tratados com MCT para desenvolvimento da HAP apresentam uma redução da expressão da proteína quinase B (Akt), da óxido nítrico sintase endotelial [38, 39] na vasculatura pulmonar, gerando prejuízos na vasodilatação arterial. Já no estudo de Ahmed et al. [40], os ratos com

HAP além de reduzirem a expressão da eNOS, também tiveram uma redução considerável nos níveis séricos de óxido nítrico, o que contribui de forma significativa para o remodelamento da vasculatura pulmonar.

Segundo Shah et al. [41], o mecanismo pelo qual a MCT leva ao desenvolvimento da HAP incluem o metabolismo da MCT no fígado pela enzima citocromo-P450 em derivados pirrólicos, em especial a dehidromonocrotalina, que são responsáveis pelo dano inicial do endotélio vascular. Porém, especula-se que este composto inicialmente desenvolve uma lesão endotelial direta que, de forma crônica, causa uma progressão irreversível dessa disfunção endotelial e, eventualmente, leva ao desenvolvimento da doença [42]. Wilson et al. [43] sugerem que o aumento de células inflamatórias mononucleares na camada adventícia de vasos intra-acinares leva ao aumento da pressão arterial pulmonar e, por consequência, ao remodelamento vascular que são características principais do modelo de HAP induzida por MCT em ratos. Sabe-se que horas após a aplicação de MCT os animais já desenvolvem danos no endotélio vascular. Logo na primeira semana, há um aumento do dano endotelial, aumento de infiltrado inflamatório e edema vascular. Em seguida, na segunda semana, observa-se o aumento da pressão arterial pulmonar característico do modelo [44].

Ademais, por exame ecocardiográfico, observou-se redução da razão entre o tempo de aceleração e o tempo de ejeção (TA/TE), que caracteriza o aumento da resistência da artéria pulmonar, que resulta em aumento da pós carga do VD em ratos com HAP induzida por MCT [45, 46]. Além disso, observa-se também nestes animais uma diminuição da TAPSE que é um importante parâmetro de avaliação da função do VD [47-49]. Estudos têm indicado que ratos tratados com MCT apresentam maior espessura da parede e do diâmetro diastólico final do VD, redução do volume sistólico e do débito cardíaco, bem como prejuízos na irrigação pulmonar e sistêmica [40, 47-49].

O modelo de HAP induzida por MCT também é caracterizado por promover aumento de apoptose das células endoteliais, proliferação de células musculares lisas e resistência destas células à apoptose [41]. Em relação à histologia da vasculatura pulmonar, observa-se neste modelo hiperplasia da camada íntima, hipertrofia da camada média e espessamento da camada adventícia [50]. Estudos indicam que a MCT causa também aumento das células inflamatórias (Ex.: macrófagos, células

dendríticas e mastócitos) e citocinas (Ex.: interleucinas 1 e 6) que são observadas principalmente nos estágios iniciais do remodelamento vascular na HAP [51, 52].

Outro órgão bastante afetado pela MCT é o pulmão. Estudos indicam aumento da massa do pulmão, da espessura do septo alveolar e redução da área dos alvéolos, o que contribui de forma significativa para o processo de hematose e dispneia [53-55]. Todas essas alterações estão relacionadas ao aumento da inflamação causada pela MCT no pulmão, que leva à redução no número de alvéolos pulmonares devido à apoptose e presença de alvéolos colapsados e hemorrágicos. Estas alterações prejudicam a funcionalidade pulmonar [56, 57].

### **1.3. Tratamento da hipertensão arterial pulmonar**

Ao longo dos anos o tratamento de indivíduos com HAP mudou de forma significativa, o prognóstico da doença era difícil e a sobrevida de 69% dos pacientes era de 1 ano e 38% de 5 anos [58, 59]. Porém, mais recentemente, com o surgimento de terapias específicas para tratamento da HAP houve um aumento significativo na taxa de sobrevivência dos pacientes de um, três, cinco e sete anos em 85%, 68%, 57% e 49%, respectivamente, a partir do diagnóstico da doença [60].

Os principais medicamentos para tratamento da HAP são direcionados à vasculatura pulmonar, como os bloqueadores dos canais de cálcio ( $Ca^{2+}$ ), antagonistas dos receptores de endotelina, agonistas do receptor e análogos de prostaciclina, que têm como principal objetivo o aumento da vasodilatação e redução da vasoconstrição arterial. Além disso, antidiuréticos, anticoagulantes e o uso de oxigênio são consideradas medidas para tratamento suporte em pacientes com HAP [1].

Porém, além do tratamento medicamentoso a prática regular de exercício físico tem sido reconhecida e recomendada para o tratamento das doenças cardíacas [61]. Nos últimos anos, evidências em estudos com humanos [62-68] e com modelos animais [69-74] indicam que o treinamento físico promove efeitos benéficos em indivíduos com HAP. Dentre os principais benefícios do exercício físico em humanos e em ratos com HAP destacam-se: a melhora da capacidade funcional e da função cardíaca global; e o aumento da tolerância ao esforço físico e da eficiência ventilatória [75, 76].

Em modelo animal, no estudo realizado por Soares et al. [72], verificou-se que a corrida voluntária, caracterizada como exercício intervalado de intensidade moderada a vigorosa, realizada durante o desenvolvimento da doença, aumenta a sobrevivência e a tolerância ao esforço físico em ratos com HAP induzida por MCT. Além disso, o modelo de exercício utilizado nesse estudo atenua o aumento da resistência da artéria pulmonar, retarda a remodelação adversa do VD e os prejuízos da HAP na contratilidade e no  $Ca^{2+}$  intracelular transiente de miócitos isolados do VD. Adicionalmente, no estudo realizado por Natali et al. [71] verificou-se que a corrida voluntária melhora a contratilidade celular em miócitos isolado do VD e aumenta a sobrevivência de ratos com HAP induzida por MCT.

O estudo realizado recentemente por Silva et al. [73] revela que a corrida de intensidade moderada em esteira, realizada durante o desenvolvimento da doença, promove aumento na tolerância ao esforço físico, previne o aumento da resistência da artéria pulmonar, a progressão dos prejuízos da HAP na contração celular e no  $Ca^{2+}$  intracelular transiente em miócitos isolados do VD de ratos com HAP induzida por MCT. Neste estudo, o treinamento físico também preveniu a remodelação adversa do ventrículo direito e do pulmão direito. Adicionalmente, o estudo realizado por Schmidt et al. [77] mostrou que o treinamento de corrida em esteira, realizado previamente, restaura as disfunções diastólica e sistólica do VE, o que está associado à prevenção de atrofia de miócitos e fibrose. No estudo de Souza-Rabbo et al. (43), observou-se que o treinamento físico aeróbico realizado em esteira aumenta a sobrevivência, previne a hipertrofia patológica do VD e reduz o estresse oxidativo em ratos com HAP induzida por MCT.

Em pacientes com HAP, o estudo de Weinstein et al. [66] mostrou que aqueles pacientes que participaram de um programa de treinamento físico aeróbico em esteira realizado 3 vezes por semana, durante 10 semanas, tiveram a tolerância ao esforço físico aumentada e a fadiga reduzida. Em outro estudo, também com o treinamento aeróbico realizado em esteira, verificou-se que tal modelo de treinamento aumenta a tolerância ao esforço físico, previne a disfunção diastólica do ventrículo esquerdo e promove melhoras na qualidade de vida de mulheres com HAP [78].

Por outro lado, estudos que avaliam efeitos do treinamento resistido, tanto em humanos como em modelos animais com HAP são escassos. Em pacientes de HAP, até o presente momento, não há estudos que tenham avaliado o efeito do treinamento resistido realizado de forma isolada. No entanto, estudos realizados em pacientes com

insuficiência cardíaca e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) revelam que há um efeito benéfico do treinamento resistido nesse público [79, 80]. Por exemplo, o estudo de Dean et al. [79] indica que o treinamento resistido, composto por sessões de dinamometria de preensão manual e por exercícios com pesos livres, melhora a função vascular periférica em pacientes com insuficiência cardíaca. Em outro estudo, o treinamento resistido, composto por sessões de exercícios para o quadríceps (extensão dinâmica e isométrica do joelho com o quadril em 90° de flexão) realizados em forma de circuito, aumentou a força muscular, melhorou o estado clínico, a capacidade de exercício e a qualidade de vida dos pacientes com falha cardíaca [80].

No estudo realizado por Silva et al. [81], em pacientes com DPOC, observou-se que o treinamento resistido (resistências elásticas e aparelhos de musculação tradicionais) foi capaz de promover um aumento da força e da massa muscular e uma diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias.

Todavia, em modelo animal, recentemente, Soares [74] mostrou que o treinamento resistido (escalada em escada vertical), aumentou a tolerância ao esforço físico e atenuou as disfunções da contratilidade do VE. Neste mesmo estudo o treinamento resistido preservou a fração de ejeção e de encurtamento, a amplitude de encurtamento e as velocidades de contração e relaxamento em cardiomiócitos isolados do VE. Ademais o treinamento resistido também preveniu o aumento da fibrose do ventrículo esquerdo e do colágeno tipo I e manteve o colágeno tipo III.

Em outro estudo realizado por Portes [82] mostrou que o treinamento resistido prévio (escalada em escada vertical) previne o aumento da resistência da artéria pulmonar (redução da TA/TE) e prejuízos na função do VD (TAPSE) em ratos com HAP induzida por MCT. Neste mesmo estudo, o treinamento resistido prévio preveniu a disfunção sistólica, a hipertrofia patológica do VD e a atrofia muscular esquelética dos ratos com HAP [82].

Além disso, estudos principalmente com o modelo experimental do rato espontaneamente hipertenso (SHR – *Spontaneously Hypertensive Rat*) mostram efeitos benéficos do treinamento resistido no sistema cardiovascular [83, 84]. Por exemplo, em estudo recente realizado por Moura [83], verificou-se que o treinamento resistido realizado em escada vertical preveniu o remodelamento causado pela hipertensão sistêmica e promoveu melhoras nas propriedades mecânicas e proteicas em ratos SHR. Em estudo realizado por Perrilhão et al. [84], que também utilizou o protocolo de escada vertical em ratas SHR, observou-se que o treinamento resistido

foi capaz de aumentar a força muscular, reduzir a pressão arterial, frequência cardíaca, tempo de relaxamento isovolumétrico e conteúdo de colágeno total.

Porém, estudos recentes têm mostrado que o treinamento físico combinado, composto por sessões de treinamento físico aeróbico e resistido de baixa e moderada intensidade, tem sido recomendado como uma ferramenta eficaz no controle de fatores de risco para doenças cardiovasculares e recomendado pelas Sociedades de Hipertensão [85-88]. O estudo realizado por Maiorana et al. [89] revela que pacientes com insuficiência cardíaca que realizaram o treinamento aeróbico (ciclismo) e resistido (musculação para membros inferiores e superiores) tiveram melhoras na função vascular dependente e independente do endotélio e melhora na capacidade vasodilatadora máxima. Em relação à HAP, o estudo realizado por González-Saiz et al. [90] indica que o treinamento físico combinado composto por sessões de treinamento muscular inspiratório específico, aeróbio e resistido promove melhoras significativas na potência muscular e em outras variáveis funcionais de indivíduos com HAP. Em estudo realizado por Kabitz et al. [91], pacientes com HAP que foram submetidos a um protocolo de treinamento combinado composto por sessões de treinamento intervalado em bicicleta ergométrica, caminhada, halteres, treinamento respiratórios e exercícios de flexibilidade, apresentaram melhoras na força muscular respiratória e na tolerância ao esforço físico. Adicionalmente, o estudo de Mainguy et al. [92], que também utilizou um programa de treinamento combinado composto por sessões de treinamento em bicicleta ergométrica, caminhada, treino com halteres em um único grupamento muscular e treinamento respiratório, indica que esse protocolo de exercício melhora a capacidade de exercício e a qualidade de vida em pacientes com HAP e insuficiência cardíaca direita.

Dessa forma, observa-se que ambos os tipos de treinamento físico, aeróbico e resistido, realizados isoladamente ou de forma combinada, parecem promover benefícios ao organismo acometido pela HAP. Porém, os mecanismos pelos quais o treinamento físico combinado promove benefícios aos indivíduos com HAP ainda permanecem pouco conhecidos. Portanto, estudos que avaliem os efeitos do treinamento físico combinado sobre a morfologia e função cardiopulmonar na HAP, juntamente com os mecanismos subjacentes a essas adaptações, são de interesse para a ampliação do conhecimento neste tema.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Investigar os efeitos do treinamento físico combinado de intensidade moderada, durante o desenvolvimento da HAP induzida por MCT, sobre a morfologia e a função cardiopulmonar em ratos.

### 2.2. Específicos

Verificar se o treinamento físico combinado de intensidade moderada, durante o desenvolvimento da HAP induzida por MCT em ratos, afeta:

- a) A sobrevivência;
- b) A tolerância ao esforço físico aeróbico e resistido;
- c) A hemodinâmica cardíaca e dimensões do VD;
- d) A amplitude de contração e as velocidades de contração e de relaxamento de cardiomiócitos isolados do VD;
- e) A amplitude e as velocidades de liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente e de decaimento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente;
- f) A morfometria tecidual do VD (contagem de miócitos, colágeno total, capilarização e infiltrado inflamatório);
- g) A morfometria tecidual do pulmão (percentual alvéolos e septos alveolares).

## 3. HIPÓTESES

- ✓ H0: O treinamento físico combinado de intensidade moderada, durante o desenvolvimento da HAP induzida por MCT, não terá efeitos sobre a morfologia e a função cardiopulmonar em ratos;
- ✓ H1: O treinamento físico combinado de intensidade moderada, durante o desenvolvimento da HAP induzida por MCT, terá efeitos benéficos sobre a morfologia e a função cardiopulmonar em ratos.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Animais e desenho experimental

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal. O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV) sob o protocolo nº 02/2021.

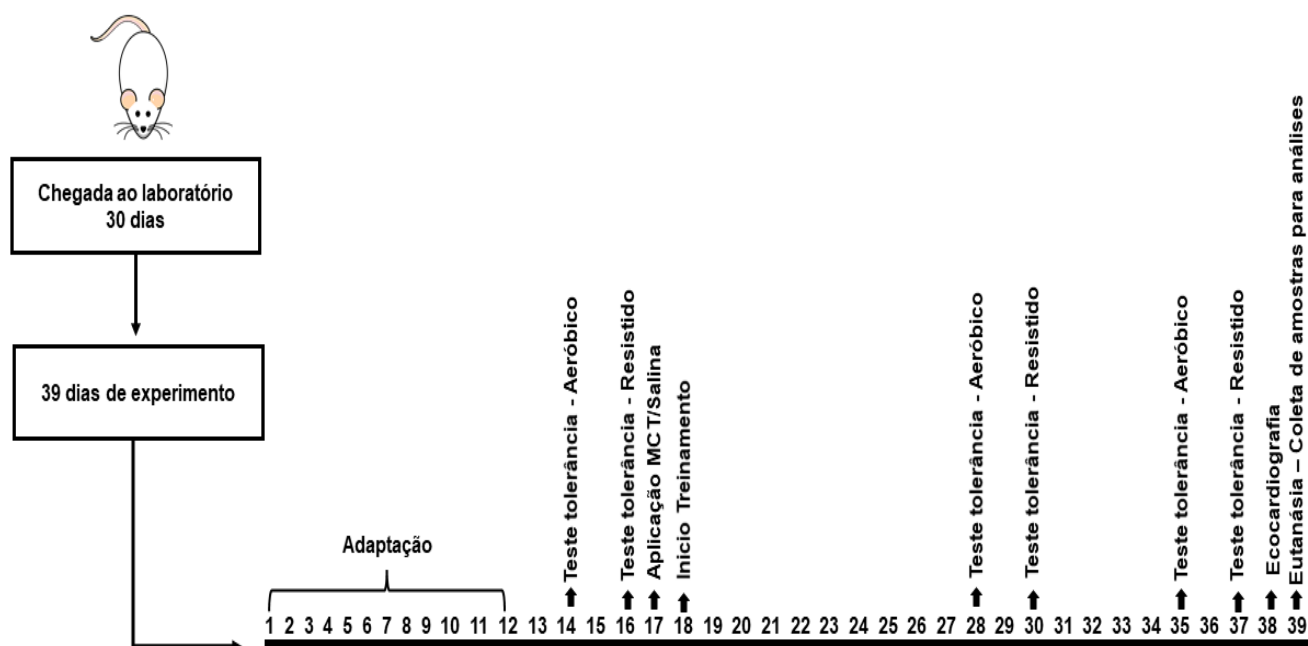
Foram utilizados 56 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com 6 semanas de idade, peso corporal de ~200 g foram utilizados. Os animais foram provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV. Os animais foram alojados em caixas de polietileno (até 5 animais por caixa) e receberam água filtrada e ração comercial ad libitum. O ambiente foi mantido em temperatura de  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , regime de luminosidade de 12/12 horas (escuro/claro) e umidade relativa de ~ 60%. A cronologia dos experimentos está ilustrada na figura 1.

Inicialmente, foi realizada a análise de sobrevivência dos animais. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais:

- Sedentário Hipertenso Sobrevivência (SHS, N=7) - animais que receberam a solução de MCT, não foram submetidos ao treinamento físico combinado e foram mantidos em suas respectivas caixas até chegarem ao óbito.
- Exercício Hipertenso Sobrevivência (EHS, N=7) - animais que receberam a solução de MCT, foram submetidos ao treinamento físico combinado até manifestarem os 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 foram mantidos em suas respectivas caixas até chegarem ao óbito.

Posteriormente, para avaliar os efeitos do treinamento físico combinado durante o desenvolvimento da HAP os animais foram divididos em três grupos experimentais:

- Sedentário Controle (SC, N=14) - Animais não submetidos ao treinamento físico combinado e que receberam solução salina;
- Sedentário Hipertenso (SH, N=14) - Animais não submetidos ao treinamento físico combinado e que receberam solução de MCT;
- Exercício Hipertenso (EH, N=14) - Animais submetidos ao treinamento físico combinado e que receberam solução de MCT;



**Figura 1.** Desenho experimental. A linha na horizontal indica os dias de experimento. As setas indicam os eventos que ocorreram ao longo do experimento.

#### 4.2. Indução da hipertensão arterial pulmonar

Os animais dos grupos SHS, EHS, SH e EH receberam uma única injeção intraperitoneal (60 mg/kg de massa corporal) de MCT (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) dissolvida em solução salina (NaCl 140 mM; pH 7,4) [71]. Os animais do grupo SC receberam o mesmo volume de solução salina (NaCl 140 mM; pH 7,4).

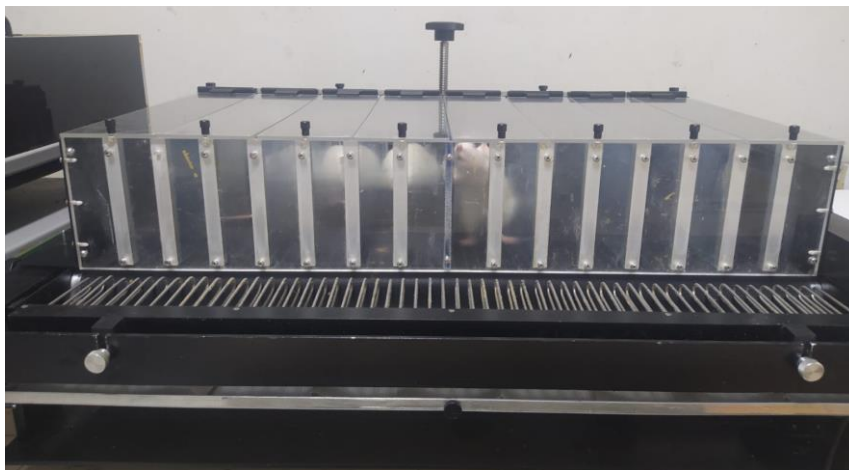
#### 4.3. Protocolo de treinamento físico combinado

O treinamento físico combinado de intensidade moderada foi realizado em esteira rolante elétrica (treinamento aeróbico) e em escada adaptada para ratos (treinamento resistido) 5 dias/semana (segunda a sexta-feira), por aproximadamente 4 semanas nos animais do grupo EHS e 3 semanas do grupo EH. Cada tipo de exercício foi realizado em um dia, de forma alternada. Diversos estudos têm justificado a utilização do treinamento físico combinado em dias alternados pela tentativa de equalização do volume de treinamento [93-95]. Além disso, segundo Sale [96], quando o treinamento físico aeróbico e resistido é realizado no mesmo dia há um prejuízo no desenvolvimento da força muscular.

Para determinar as intensidades de cada tipo de treinamento, os ratos foram avaliados previamente quanto à velocidade de corrida na esteira e carga máxima carregada na escada vertical.

#### 4.3.1. Teste de velocidade máxima de corrida

Foi utilizado o modelo de treinamento de corrida em esteira (Figura 2). A velocidade máxima de corrida (VMC) foi medida para estabelecer a intensidade do treinamento aeróbico.



**Figura 2.** Esteira ergométrica para ratos.

Os ratos foram familiarizados com a esteira rolante elétrica (AVS Projetos®, São Paulo, Brasil) por 2 semanas. Na semana 1, os animais foram submetidos a um curto período de exercício leve (5 min, sem inclinação, 5 m/min) por 3 dias (alternados com o treinamento resistido). Na semana 2 (10 min/dia, sem inclinação, 5m/min) por 3 dias (alternados com o treinamento resistido). Quarenta e oito horas após o período de adaptação foi realizado o teste de tolerância ao esforço físico.

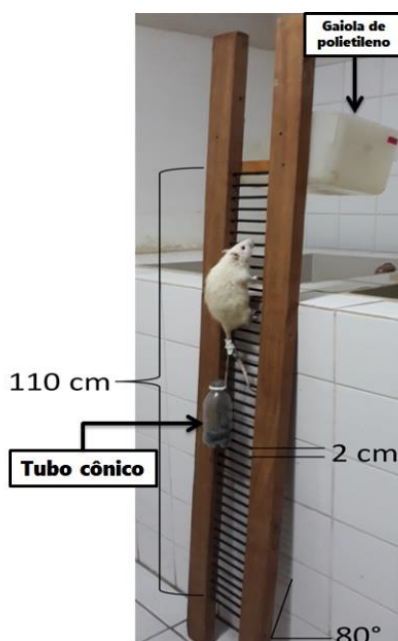
A VMC foi avaliada por um protocolo de exercício progressivo em esteira, como previamente descrito [97]. A intensidade inicial da corrida foi de 5m/min e foram feitos incrementos de 3m/min a cada 3 minutos, sem inclinação, até a fadiga. O momento da fadiga foi definido e o teste foi interrompido quando os animais não mantiveram a corrida de acordo com a velocidade da esteira [97]. Ao término foi registrado o tempo total e a velocidade de máxima de corrida atingida por cada rato. Este foi realizado em 3 momentos: 2 dias após a familiarização do animal com o equipamento, no 12º e 19º dias após a aplicação da MCT. O tempo total até a fadiga (TTF) foi utilizado como índice de tolerância ao esforço físico aeróbico.

### 4.3.2. Treinamento físico aeróbico

Os animais dos grupos EHS e EH foram submetidos a um protocolo de treinamento de corrida de intensidade moderada em esteira [98]. O treinamento foi iniciado 24h após a aplicação da MCT, usando-se esteira rolante elétrica (AVS Projetos®, São Paulo, Brasil). O treinamento foi realizado 2/3 dias por semana, alternados com o treinamento resistido, 60 minutos por dia. Cada sessão consistiu em um período de aquecimento (5 min; velocidade: 20 % da VMC), outro de treinamento (50 min; velocidade: 60 % da VMC) e outro de desaquecimento (5 min; velocidade: 20 % da VMC). Na primeira semana, a velocidade inicial foi de 5m/min e incrementos de 3m/min a cada 3 minutos, até atingir 60% da VMC. Ao final da segunda semana de treinamento as intensidades de corrida foram reajustadas, de acordo com a VMC obtida no teste de tolerância ao exercício.

### 4.3.3. Teste de carga máxima carregada

Foi utilizado o modelo de exercício resistido denominado escalada em escada vertical (Figura 3). A carga máxima carregada (CMC) foi medida para estabelecer a intensidade do treinamento resistido.



**Figura 3.** Escada vertical e aparato para sobrecarga externa para realização do treinamento resistido [83].

Inicialmente, os ratos foram familiarizados por 2 semanas ao modelo de exercício que consiste em escalar uma escada vertical (Altura: 1,1 m; Largura: 0,18 m; Espaçamento entre degraus: 2 cm; Inclinação: 80°) com carga proporcional colocada em um aparato fixado na cauda.

Na primeira semana, os animais foram estimulados a realizar de 8 a 12 escaladas (repetições), e permanecerem no topo da escada por 120 segundos em uma caixa de polipropileno. Na segunda semana, o animal realizou 3 escaladas carregando um recipiente de carga adaptado (~15 gramas), sem peso, fixado na parte proximal da cauda por uma fita adesiva.

Para a realização do teste, na escalada inicial o rato escalava a escada carregando 75% do seu peso corporal. Após completar a escalada com sucesso e obedecido o intervalo de descanso (120 segundos), um peso adicional de 30 gramas foi adicionado para a próxima escalada. Este procedimento foi sucessivamente repetido até que o rato não pudesse realizar a escalada até o topo da escada. O peso máximo com o qual o rato conseguiu fazer a escalada foi considerado a carga máxima carregada.

O teste de carga máxima carregada foi realizado em 3 momentos: 4 dias após a adaptação ao modelo de exercício, no 14º e 21º dias após a aplicação da MCT. A CMC absoluta e relativa foram (Divisão da CMC absoluta pelo peso corporal do animal) utilizadas como índice de tolerância ao esforço resistido.

#### **4.3.4. Treinamento físico resistido**

Os animais dos grupos EHS e EH foram submetidos a um protocolo de treinamento resistido adaptado [99]. O treinamento resistido foi iniciado 48h após a aplicação de MCT, usando-se uma escada vertical adaptada para ratos (Figura 3). De acordo com o teste de carga máxima individual, os animais realizaram o treinamento resistido 2/3 dias por semana alternado com o treinamento aeróbico, durante aproximadamente 4 semanas. Cada sessão de treinamento resistido consistiu em 15 escaladas por sessão com um intervalo de 1 minutos entre as escaladas [87]. As sessões de treinamento foram realizadas com intensidade de 60% da carga máxima atingida nos testes máximos, portanto intensidade moderada.

#### 4.4. Ecocardiografia

O exame ecocardiográfico foi realizado no 22<sup>o</sup> dia após a primeira injeção de MCT. Resumidamente, os animais foram imobilizados por anestesia (Isoflurano 3% em oxigênio 100% para indução e a 1,5% para manutenção, em fluxo constante de 1L/min; Isoflurano, BioChimico, ItatiaiaRJ, Brasil) e 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 o sistema de ultrassom MyLabTM30 (Esaote, Genoa, Itália) e transdutores de 10 MHz de frequência nominal. O ecocardiograma transtorácico bidimensional e o Modo M foram obtidos em velocidade de varredura de 200mm/s ajustados de acordo com a frequência cardíaca. Os valores de tempo de aceleração (TA) e de ejeção (TE) do VD foram obtidos por meio do Doppler pulsátil.

A avaliação da função sistólica do VD foi mensurada a partir da excursão sistólica no plano anular da válvula tricúspide (TAPSE - Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion). Para tal, foi utilizado o modo M com cursor posicionado na porção lateral do plano anular da tricúspide. Mediu-se o encurtamento da base para o ápice durante a sístole, identificando o ânulo lateral da valva tricúspide, a distância diastólica e sistólica final. A coleta das imagens foi realizada de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia, e essas foram, em seguida, armazenadas para posterior análise [100]. Os seguintes parâmetros relacionados ao VD foram avaliados: função sistólica, por meio da TAPSE, do TA e TE, e, posteriormente, calculou-se a razão TA/TE.

#### 4.5. Coleta de amostras

Os animais dos grupos SHS e EHS foram deixados em suas respectivas caixas até que estes chegassem ao óbito. Determinados os dias após a injeção de MCT em que os óbitos ocorreram, foi realizada a análise de sobrevivência em ambos os grupos. A eutanásia dos animais dos grupos SC, SH e EH foi realizada na mediana de sobrevivência do grupo SHS (23<sup>o</sup> dia após injeção) ou quando os animais dos grupos SH e EH manifestaram sinais clínicos de falha do VD. Todos os animais sofreram eutanásia por decapitação, sem utilização de anestesia prévia, usando-se uma guilhotina própria para o uso em roedores (Insight EB 271). Após eutanásia, o coração

e o pulmão direito foram dissecados, pesados e processados para as análises de interesse, conforme descrito a seguir. A tíbia direita foi dissecada e teve seu comprimento mensurado.

#### **4.6. Análises histológicas e morfometria do ventrículo direito e pulmão**

As análises histológicas e morfométricas foram realizadas conforme descrito anteriormente (29). Em suma, fragmentos de amostras do VD e pulmão direito 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 seções.

Para as análises histomorfométricas, as lâminas foram visualizadas em fotomicroscópio de campo claro (Olympus BX-53, Tokyo, Japan) e as imagens capturadas, utilizando uma câmera digital (Olympus AX-70; Tokyo, Japan). As análises estereológicas foram realizadas em dez imagens aleatórias (aumento de 20x) de cada animal/órgão. Os parâmetros avaliados foram quantificados utilizando uma grade com 266 interseções, sobreposta às imagens, totalizando 2.660 pontos para cada animal/órgão. As estruturas de interesse para cada órgão foram contadas e os valores expressos em porcentagem. 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 8.01.

##### **4.6.1. Histomorfometria do ventrículo direito**

Para análise histomorfométrica do VD, utilizaram-se duas orientações: a orientação longitudinal para mensuração do percentual de cardiomiócitos (citoplasma e núcleo), vasos sanguíneos, infiltrado inflamatório e colágeno total, quantificados usando o Software Image J® (National Institute of Health, USA). A orientação transversal foi utilizada para quantificação da área de secção transversa do cardiomiócito. Para análise na orientação transversal, foram utilizadas 30 células de

cada animal, quantificadas utilizando o Software Image ProPlus 4.5 (Media Cybernetics; Silver Spring, USA).

#### **4.6.2. Histomorfometria do pulmão direito**

Na análise histomorfométrica do pulmão, utilizou-se a borda superior do lobo direito para a quantificação do percentual de septos alveolares e alvéolos pulmonares. Usou-se, também, o Software Image J® (National Institute of Health, USA).

#### **4.7. Isolamento dos cardiomiócitos**

Os miócitos do VD foram isolados enzimaticamente, conforme descrito anteriormente (30). Após a eutanásia, realizou-se uma toracotomia e o coração foi rapidamente removido, pesado em balança de precisão (modelo AG 200, Gehaka, Brasil) e lavado em solução básica contendo 750 mM de  $\text{CaCl}_2$  (Solução A; Item 4.11.1) para retirar o excesso de sangue antes da perfusão das soluções de isolamento. Após este procedimento, o coração foi transferido para uma placa de petri, a aorta ascendente foi fixada com um fio de sutura em uma agulha de aço inoxidável modificada (cânula), e o coração isolado foi colocado em um sistema de perfusão (Langendorff adaptado) e perfundido com a solução de isolamento (Solução A; Item 4.17), em um fluxo constante até que os vasos coronários estivessem limpos.

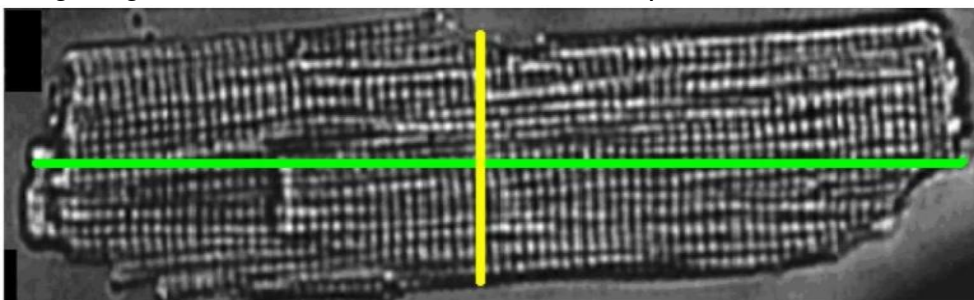
Em seguida, trocou-se a solução de canulação para solução livre de  $\text{Ca}^{2+}$  contendo 0,1 mM de ácido tetracético etilenoglicol (EGTA) (Solução B; Item 4.11.1), durante 6 minutos, para o rompimento dos discos intercalares entre os cardiomiócitos. Posteriormente, o coração foi perfundido com a solução contendo 30 mg.ml<sup>-1</sup> de colagenase tipo II (Worthington, EUA), 3 mg.mL de protease e 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$  (Solução C; Item 4.8.1), durante 10 minutos, para destruição das fibras extracelulares. Todas as soluções utilizadas no procedimento de isolamento foram oxigenadas ( $\text{O}_2$  100% – White Martins, Brasil) e mantidas em temperatura de 37°C. Ao final da perfusão os ventrículos foram separados dos átrios e pesados em balança de precisão (Gehaka – Brasil, modelo AG 200). O ventrículo direito foi removido, pesado e colocado em frasco contendo solução enzimática (Solução C; Item 4.11.1). O frasco foi agitado moderadamente durante 5 minutos, em “banho-maria” à temperatura de 37°C, sendo o tecido cardíaco oxigenado ( $\text{O}_2$  100% – White Martins, Brasil). Em

seguida, o conteúdo do frasco foi filtrado e centrifugado (3000 rpm) por 10 segundos. O sobrenadante foi removido e os cardiomiócitos suspensos na solução básica contendo 750 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Esse processo foi repetido duas vezes. Os cardiomiócitos foram armazenados em refrigerador para as análises, que foram feitas em até quatro horas após o isolamento.

#### 4.8. Mensuração do comprimento e largura celular

Os miócitos isolados foram acomodados em uma câmara experimental e banhados por solução de perfusão em temperatura ambiente ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ). As imagens das células foram captadas por uma câmera (MyoCam, Ionoptix, Milton, MA, EUA) acoplada a um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100, Melville, NY EUA). Em seguida, as imagens foram visualizadas horizontalmente, com aumento de 400x por meio de lente de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, Melville, NY EUA) no monitor de um microcomputador, utilizando um programa de captura de imagens (M-Vision 5XX, Ionoptix, Milton, MA, EUA).

O comprimento celular foi determinado a partir da medição da imagem da célula gerada no monitor, desde a borda direita até a borda esquerda, no ponto médio da largura do cardiomiócito (Figura 4). A largura celular foi determinada medindo-se a imagem gerada no monitor, desde a borda superior até a borda inferior.



**Figura 4.** Representação das dimensões de cardiomiócito do VD. As linhas indicam como foram obtidos o comprimento (verde) e largura (amarelo) [101].

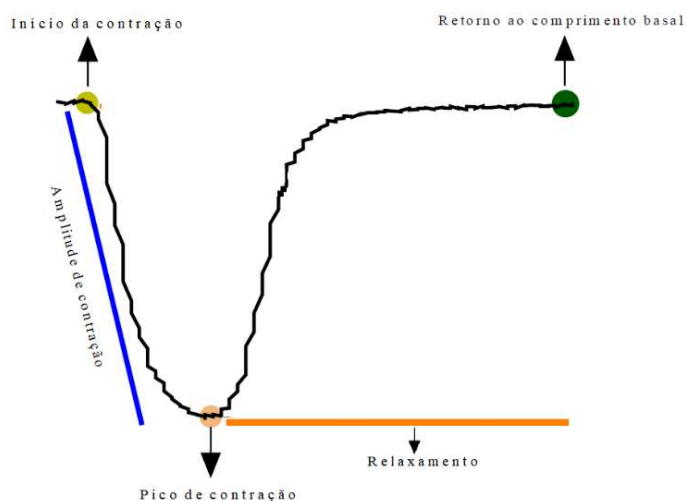
Para mensuração do comprimento e da largura dos cardiomiócitos, utilizou-se uma régua de precisão de 1 milímetro. Na calibração do sistema, cada centímetro correspondia a 12 micrômetros. Somente foram utilizadas, para as medições, as células que estavam em boas condições, com as bordas e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxadas em repouso, sem apresentar contrações espontâneas.

#### 4.9. 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 em um microscópio invertido e banhados por solução banhados pela solução de perfusão tampão (solução tampão HEPES; Item 4.11.2) à temperatura de 37°C. Os cardiomiócitos foram estimulados externamente na frequência de 5 Hz (10 Volts, duração de 5 ms) usando-se um estimulador elétrico (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, EUA). A imagem do cardiomiócito em avaliação foi capturada por uma câmera (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada ao microscópio invertido, utilizando-se um programa de detecção de imagens (Ionwizard, Ionoptix, EUA - frequência de 240 Hz).

Os movimentos de contração e relaxamento do miócito foram capturados pelo sistema de detecção de bordas (Ionwizard, Ionoptix, EUA) e armazenados para análise posterior das propriedades mecânicas. Foram utilizados para os experimentos, somente os cardiomiócitos que estavam em boas condições, com as bordas (direita e esquerda) e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso, sem apresentar contrações involuntárias. As variáveis analisadas foram: amplitude de contração, velocidade de contração e velocidade de relaxamento (Figura 5).



**Figura 5.** Traçado representativo da contração celular [83].

#### 4.10. Mensuração do $\text{Ca}^{2+}$ intracelular transiente

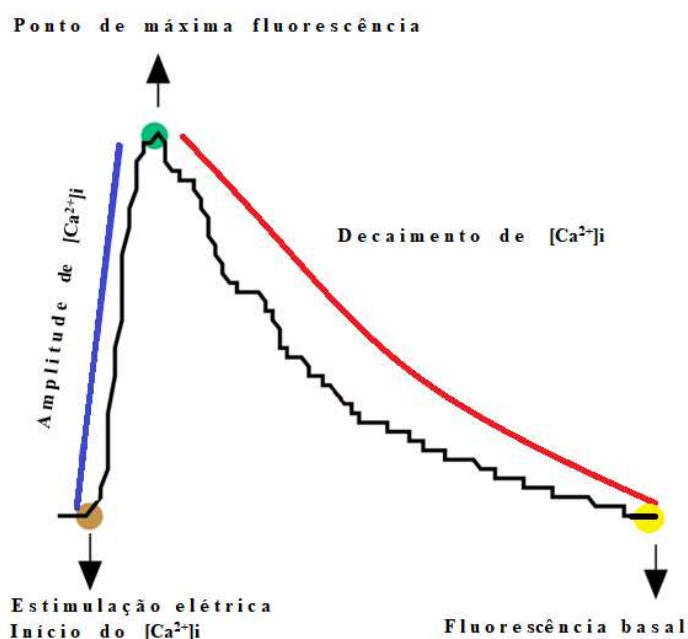
As medidas do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente de cardiomiócitos isolados do VD foram realizadas conforme descrito anteriormente (31). Em suma, as medidas foram feitas utilizando-se um microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, EUA) equipado com uma lente objetiva de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, EUA).

Os cardiomiócitos isolados foram incubados com o indicador fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$ , 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  $\mu\text{l}$  de DMSO em 50 $\mu\text{g}$  de Fura-2 AM). Adicionou-se 10 $\mu\text{l}$  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  $\pm 120\text{x/mim}$ ). 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  $\text{CaCl}_2$  (solução A; Item 4.17).

Após esse procedimento, os cardiomiócitos foram levados para um refrigerador (5 $^{\circ}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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 pela solução de perfusão tampão (solução tampão *HEPES*, Item 4.11.2) em temperatura ambiente.

O cardiomiócito em avaliação foi posicionado dentro de uma janela ajustável, com bordas aparentes, e estimulados externamente na frequência de 5 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. Foram utilizados somente os cardiomiócitos que estavam em boas condições, com as bordas (direita e esquerda) e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso, sem apresentar contrações involuntárias. Os registros foram sempre feitos até quatro horas após o isolamento dos cardiomiócitos. As variáveis analisadas foram: Amplitude de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente, velocidade

de liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente e velocidade de decaimento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente (Figura – 6).



**Figura 6.** Traçado representativo do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente [83].

## 4.11. Composição das soluções

### 4.11.1. Soluções de isolamento

As soluções utilizadas para o isolamento dos cardiomiócitos foram feitas usando-se um litro de uma solução básica com água ultrapura (Milli Q), com a seguinte composição (em mM): NaCl (130) – 7,6 g/l;  $\text{MgCl}_2$  (1,43) - 0,28 g/l; KCl (5,4) – 0,4 g/l; (HEPES) (10) – 0,062 g/l; glicose (10) – 1,8 g/l; taurina (20) – 2,38 g/l; e creatina (10) – 1,3 g/l. O pH foi ajustado em 7,4 em temperatura ambiente.

- **Solução A:** Para fazer a solução de isolamento contendo 750 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , foram adicionados 375  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  (1 M) em 500 ml da solução básica
- **Solução B:** Para a solução de isolamento livre de  $\text{Ca}^{2+}$ , foram adicionados 250  $\mu\text{l}$  de EGTA (100 mM) em 250 ml da solução básica.
- **Solução C:** Para a solução enzimática de isolamento, foram adicionados 0,030 g de colagenase e 0,003g de protease em 30 mL da solução básica.

#### 4.11.2. Solução de perfusão-tampão hepes

Para a mensuração da contratilidade celular e do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente, os miócitos foram banhados com uma solução fisiológica contendo (em mM):

- **Solução estoque:** NaCl (113) – 65,99 g/l; HEPES (5) – 11,9 g/l;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1) – 1,42 g/l;  $\text{MgSO}_4$  (1) – 2,46 g/l; KCl (5) – 3,72 g/L;
- **Solução sopa:** acetato de Na (20) – 16,4 g/100 mL; glicose (10) – 18,1 g/100 mL; e insulina (5 u/L) – 0,5 g/100 mL.

Para fazer um litro da solução de perfusão-tampão HEPES, foram adicionados 100 mL da solução-estoque, 10 mL da solução sopa e 1,8 mL de  $\text{CaCl}_2$  (1) a 890 mL de água ultrapura (Milli-Q). Essa solução foi equilibrada para um pH = 7,4 e mantida em temperatura ambiente.

#### 4.12. Análise estatística

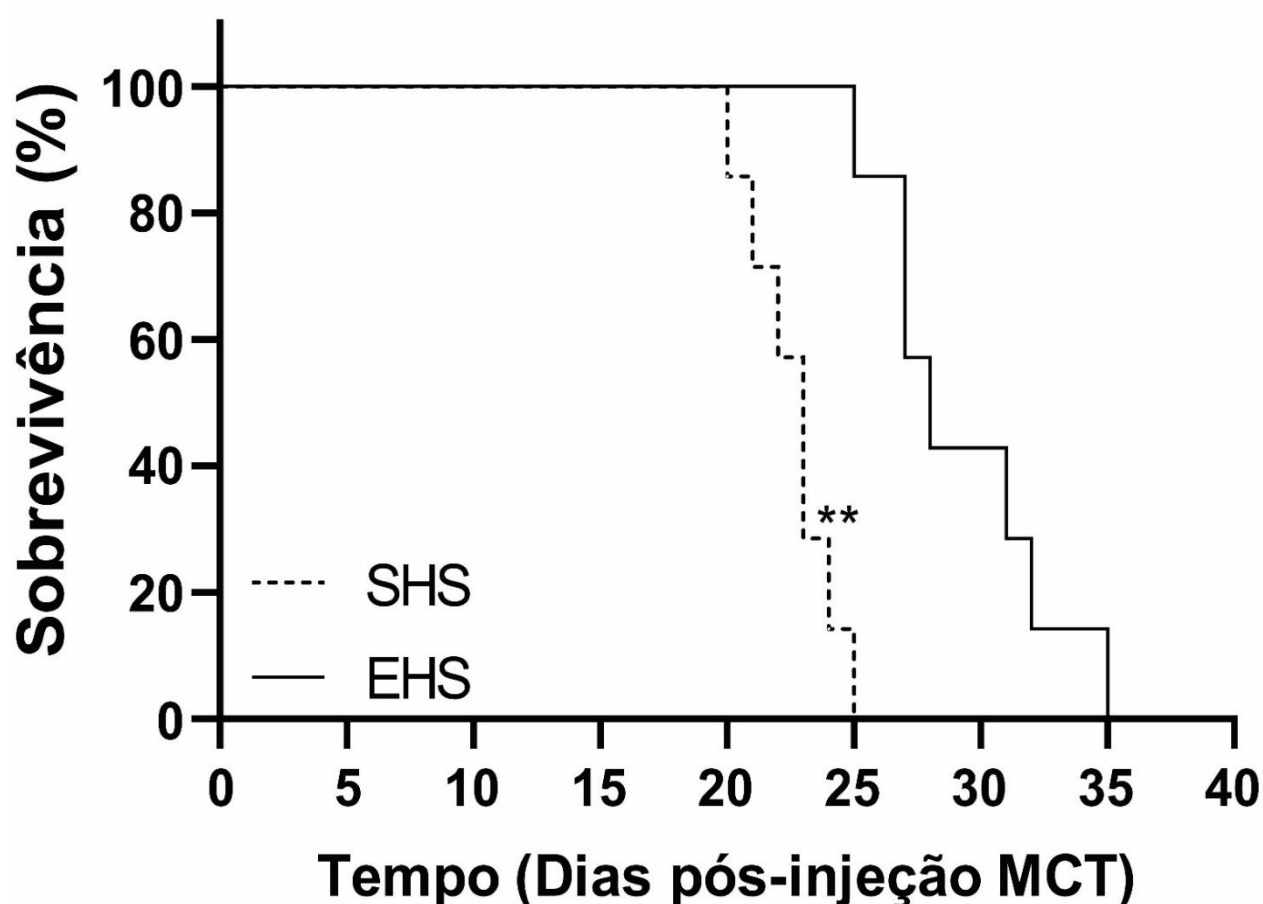
Os dados foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk para verificar a sua distribuição. Para os dados paramétricos, usou-se a análise de variância de uma entrada (ANOVA one-way), para avaliação entre grupos, seguida do *post hoc* de Tukey para comparações múltiplas, quando necessário. Para os dados não paramétricos, utilizou-se o Kruskal-Wallis, seguido do *post hoc* de Dunn's para as comparações múltiplas, quando necessário. Os dados de sobrevivência foram comparados usando-se a análise da curva de Kaplan-Meier pelo teste de Log-rang.

Os dados quantitativos são apresentados como média  $\pm$  EPM, enquanto os dados qualitativos são apresentados como porcentagem. Uma probabilidade de erro alfa de até 5% foi considerada. Os testes estatísticos e os números de animais e células usados em cada parâmetro avaliado estão discriminados nas respectivas tabelas e figuras. Todas as análises foram realizadas usando o Software GraphPad Prism versão 8.0.2.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Sobrevivência e peso corporal

A figura 7 apresenta os dados de sobrevivência dos animais dos grupos experimentais SHS e EHS. Embora todos os animais desses grupos tenham chegado ao óbito, os animais do grupo EHS tiveram mediana de sobrevivência maior (29 dias) do que os do grupo SHF (23 dias;  $p < 0,05$ ), indicando um efeito positivo do programa de treinamento físico combinado.



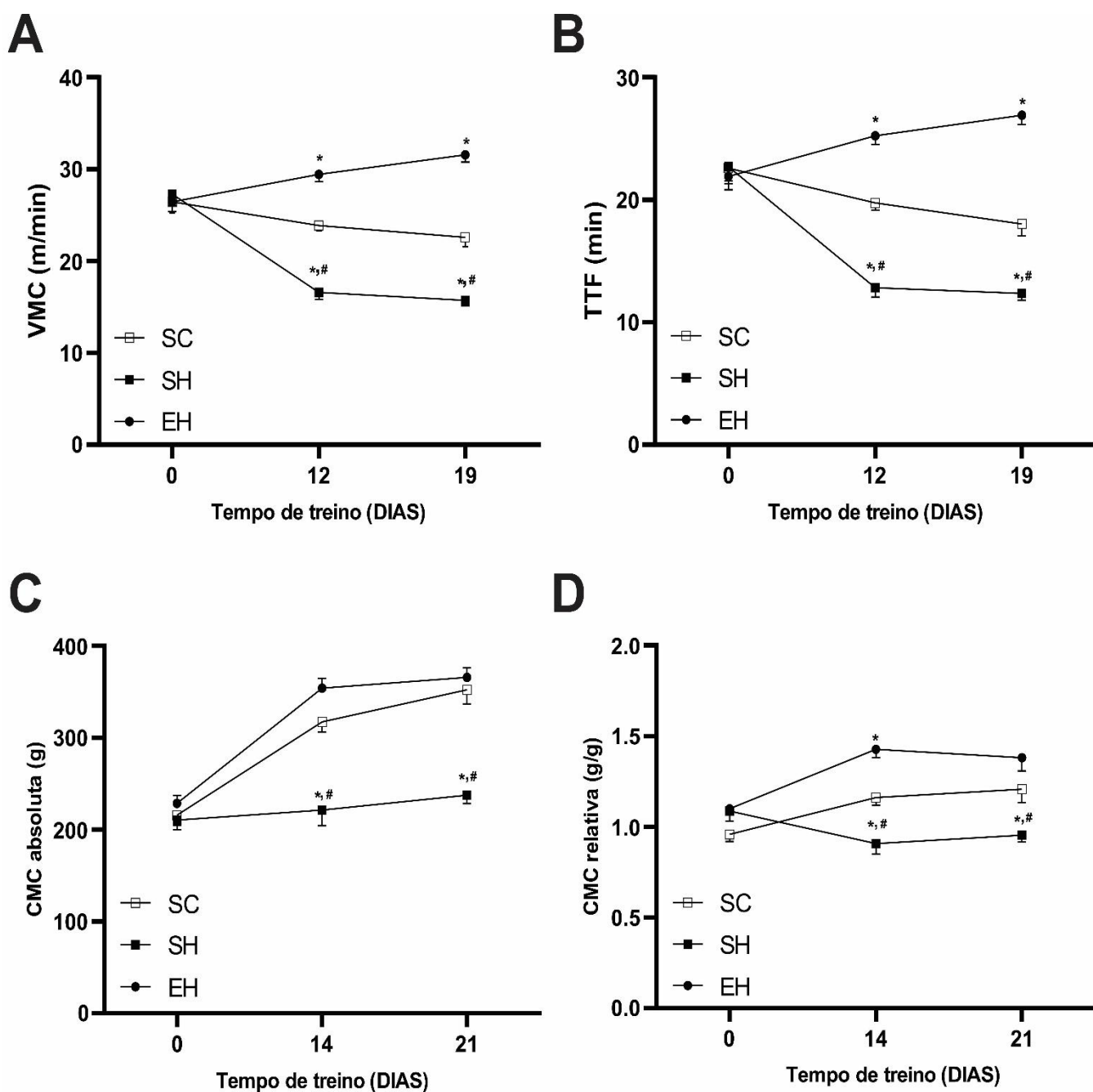
**Figura 7.** Sobrevivência de animais com hipertensão arterial pulmonar. SHS, sedentário hipertenso sobrevivência. EHS, exercício hipertenso sobrevivência.  $**P < 0,05$  vs. EHF. Curva Kaplan-Meier, com teste post-hoc Log-rank. Dados são medianas de 7 ratos em cada grupo.

## 5.2. Tolerância ao esforço físico

A figura 8 apresenta os dados de VMC (Fig. 8A), TTF (Fig. 8B), CMC absoluta (Fig. 8C) e CMC relativa (Fig. 8D) referentes aos testes de tolerância ao esforço físico aeróbico realizados no dia 0 antes da aplicação da MCT, 12<sup>o</sup> e 19<sup>o</sup> dia após a aplicação da MCT; e resistido realizados no dia 0 antes da aplicação da MCT, 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia após a aplicação da MCT.

Não houve diferença entre os grupos antes da aplicação da MCT para a VMC (Fig. 8A) e o TTF (Fig. 8B). Todavia, no 12<sup>o</sup> e 19<sup>o</sup> dias após a aplicação de MCT os animais do grupo SH tiveram VMC e TTF menores ( $p < 0,05$ ), em comparação aos animais dos grupos SC e EH. Observou-se também que nestes mesmos momentos os animais do grupo EH tiveram VMC e TTF maiores ( $p < 0,05$ ) que os dos animais do grupo SC (Fig. 8A e 8B).

Não houve diferença entre os grupos antes da aplicação da MCT para as CMC absoluta (Fig. 8C) e relativa (Fig. 8D) (Fig. 8C e 8D). Porém, no 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias após a aplicação de MCT os animais do grupo SH apresentaram CMC absoluta e relativa menores ( $p < 0,05$ ), em comparação às dos animais dos grupos SC e SH. Observou-se também que no 14<sup>o</sup> dia após a aplicação os animais do grupo EH apresentaram CMC relativa maior ( $p < 0,05$ ) que a dos animais do grupo SC.



**Figura 8.** Tolerância esforço físico. (A) Velocidade máxima de corrida (VMC). (B) Tempo total até a fadiga (TTF). (C) Carga máxima carregada (CMC) absoluta. (D) Carga máxima carregada (CMC) relativa. Testes realizados antes (dia 0), 12, 14, 19 e 21 dias após a aplicação de monocrotalina (MCT). Dados são médias  $\pm$  EPM de 7 ratos em cada grupo. SC sedentário controle; SH, sedentário hipertenso; EH, exercício hipertenso. \* $P < 0,05$  vs. SC; #  $< 0,05$  vs. SH. *One-Way ANOVA* seguida do teste post hoc de Tukey.

### 5.3. Peso corporal, peso dos órgãos e suas razões

A tabela 1 apresenta os dados de peso corporal, peso dos órgãos e suas razões. Não houve diferença entre os grupos para o peso corporal inicial. Contudo, 23 dias após a aplicação de MCT (peso final) os ratos dos grupos SH e EH tiveram menor ( $p < 0,05$ ) peso corporal, em comparação ao do grupo SC.

Além disso, os animais do grupo SH, quando comparados aos dos grupos SC e EH, apresentaram maior do peso do coração, peso do VD, peso do pulmão direito e suas respectivas razões ( $p < 0,05$ ); enquanto os animais do grupo EH apresentaram a razão peso do pulmão/comprimento da tíbia maior ( $p < 0,05$ ) que a dos animais do grupo SC.

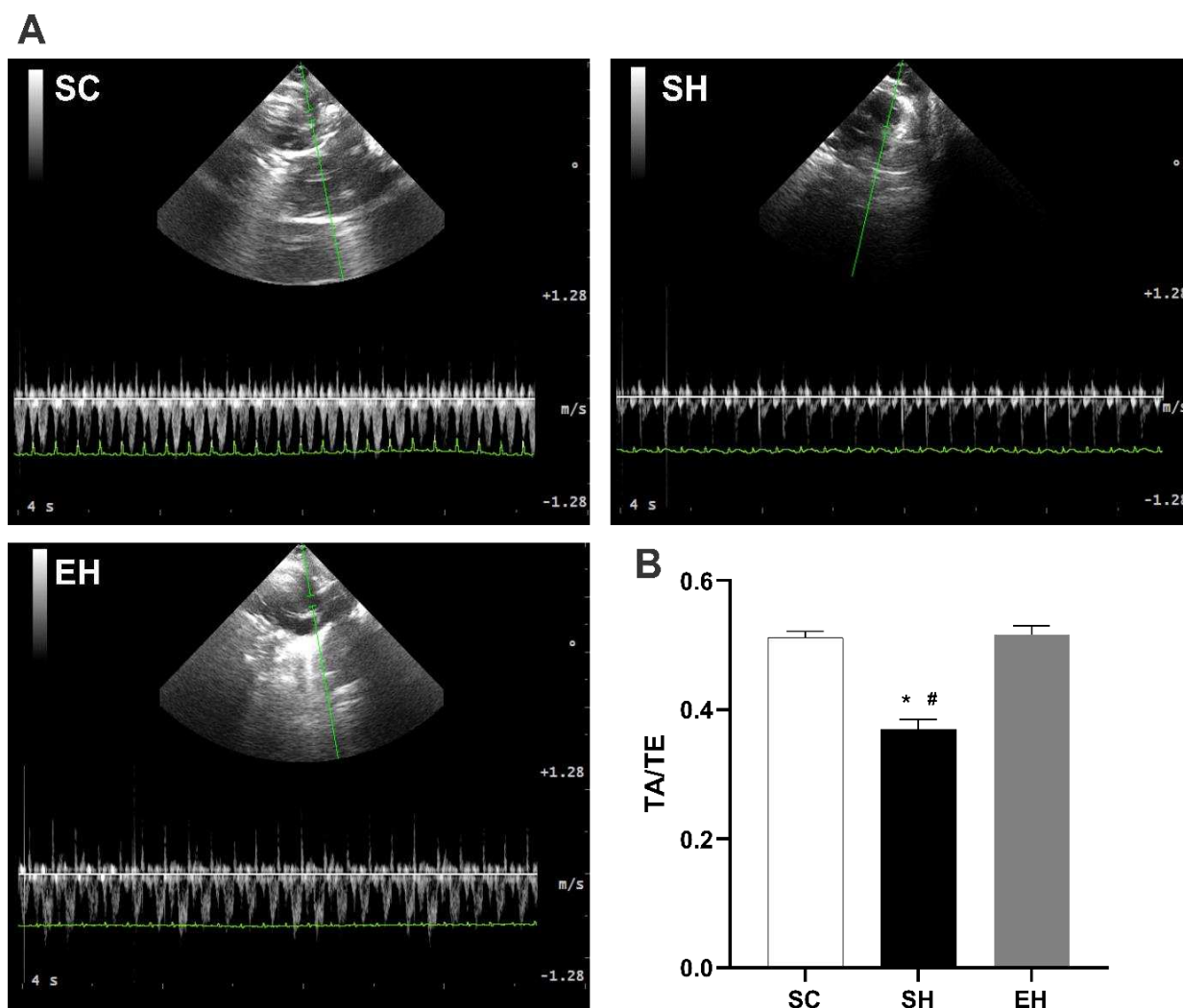
**Tabela 1.** Peso corporal, peso dos órgãos e suas razões.

	SC	SH	EH
PC inicial (g)	197,4 ± 4,85	192,0 ± 3,26	204,4 ± 4,42
PC final (g)	307,1 ± 4,96	260,3 ± 9,03*	277,6 ± 9,70*
PCor (g)	1,18 ± 0,03	1,44 ± 0,04**	1,18 ± 0,02
PV (g)	0,82 ± 0,01	0,92 ± 0,02	0,83 ± 0,05
PVD (g)	0,23 ± 0,02	0,41 ± 0,06**	0,28 ± 0,02
VD/VE (g)	0,41 ± 0,01	0,90 ± 0,02**	0,50 ± 0,02
PPD (g)	1,85 ± 0,53	4,36 ± 0,60**	2,43 ± 0,04
Pcor/Comprimento Tíbia (mg/mm )	0,35 ± 0,00	0,47 ± 0,03**	0,34 ± 0,02
VD/Comprimento Tíbia (mg/mm )	0,06 ± 0,00	0,12 ± 0,01**	0,08 ± 0,00
VE/Comprimento Tíbia (mg/mm )	0,16 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,00
PPD/Comprimento Tíbia (mg/mm)	53,52 ± 5,73	129,5 ± 5,59**	72,49 ± 2,29*

Dados são médias ± EPM de 6-7 ratos em cada grupo. SC, sedentário controle; SH, sedentário hipertenso; EH, exercício hipertenso. PC, peso corporal; PCor, peso do coração; PV, peso dos ventrículos; PVD, peso do ventrículo direito; PVE, peso do ventrículo esquerdo; PPD, peso do pulmão direito. \* $P < 0,05$  vs. SC; \*\* $P < 0,05$  vs. EH. One-Way ANOVA seguida do teste post hoc de Tukey.

#### 5.4. Resistência da artéria pulmonar

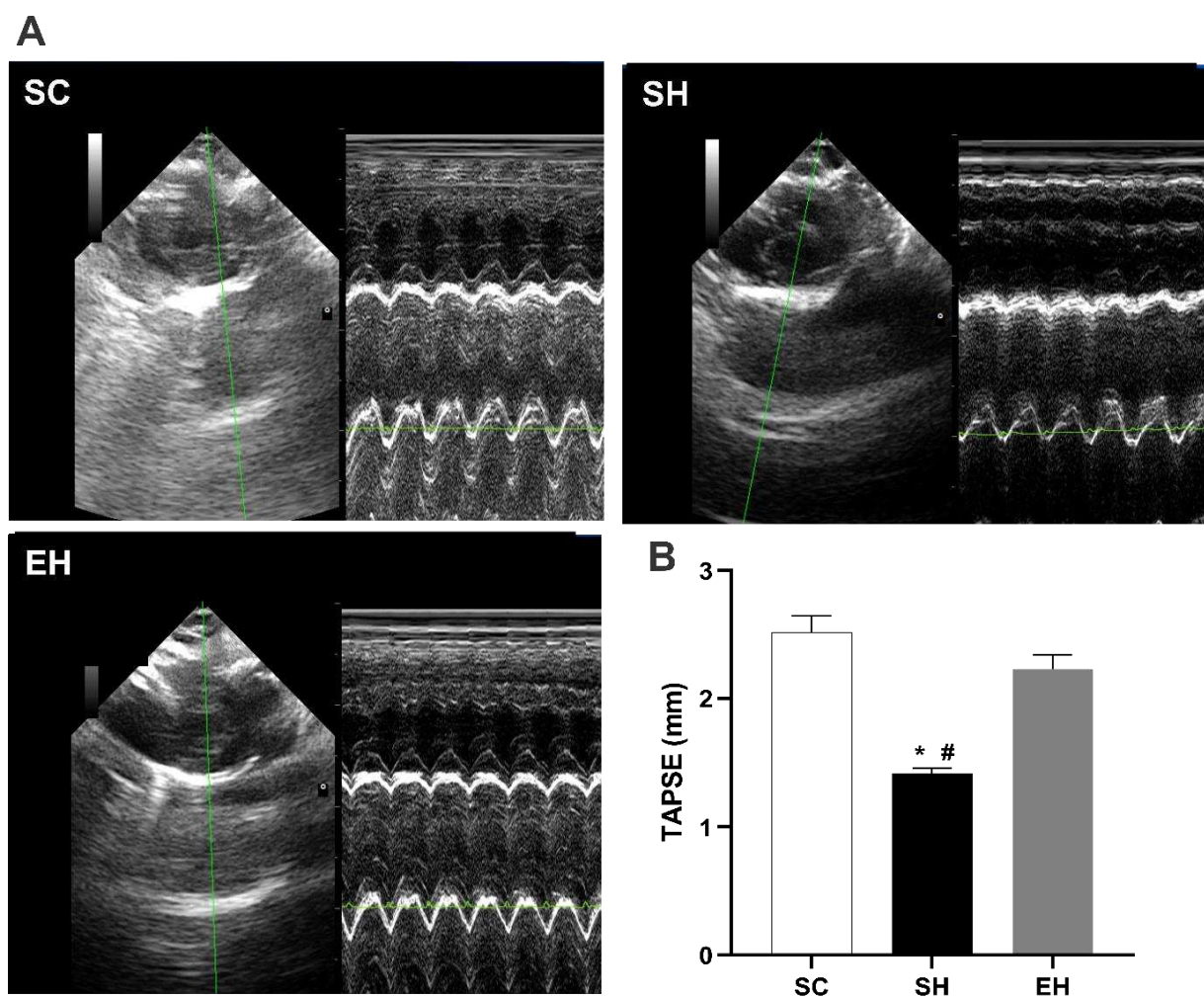
A Figura 9 mostra os resultados referentes a resistência na artéria pulmonar estimada pela razão TA/TE. No painel 9A, encontra-se imagens ecocardiográficas representativas do fluxo da artéria pulmonar obtidas por meio de Doppler de onda pulsátil. No 22º dia após a aplicação de MCT, os animais do grupo SH tiveram menor ( $p < 0,05$ ) razão TA/TE, em comparação a dos animais dos grupos SC e EH (Fig. 9B).



**Figura 9.** Resistência da artéria pulmonar. (A) Imagens representativas do fluxo da artéria pulmonar. (B) Relação tempo de aceleração/tempo de ejeção (TA/TE) medido no 22º dia após injeção de MCT. Dados são médias  $\pm$  EPM de 6-7 ratos em cada grupo. SC, controle sedentário; SH, Sedentário hipertenso; EH, Exercício hipertenso. *One-Way ANOVA* seguida do teste post hoc de Tukey. \* $P < 0,05$  vs. SC; #  $P < 0,05$  vs. EH.

## 5.5. Função do ventrículo direito

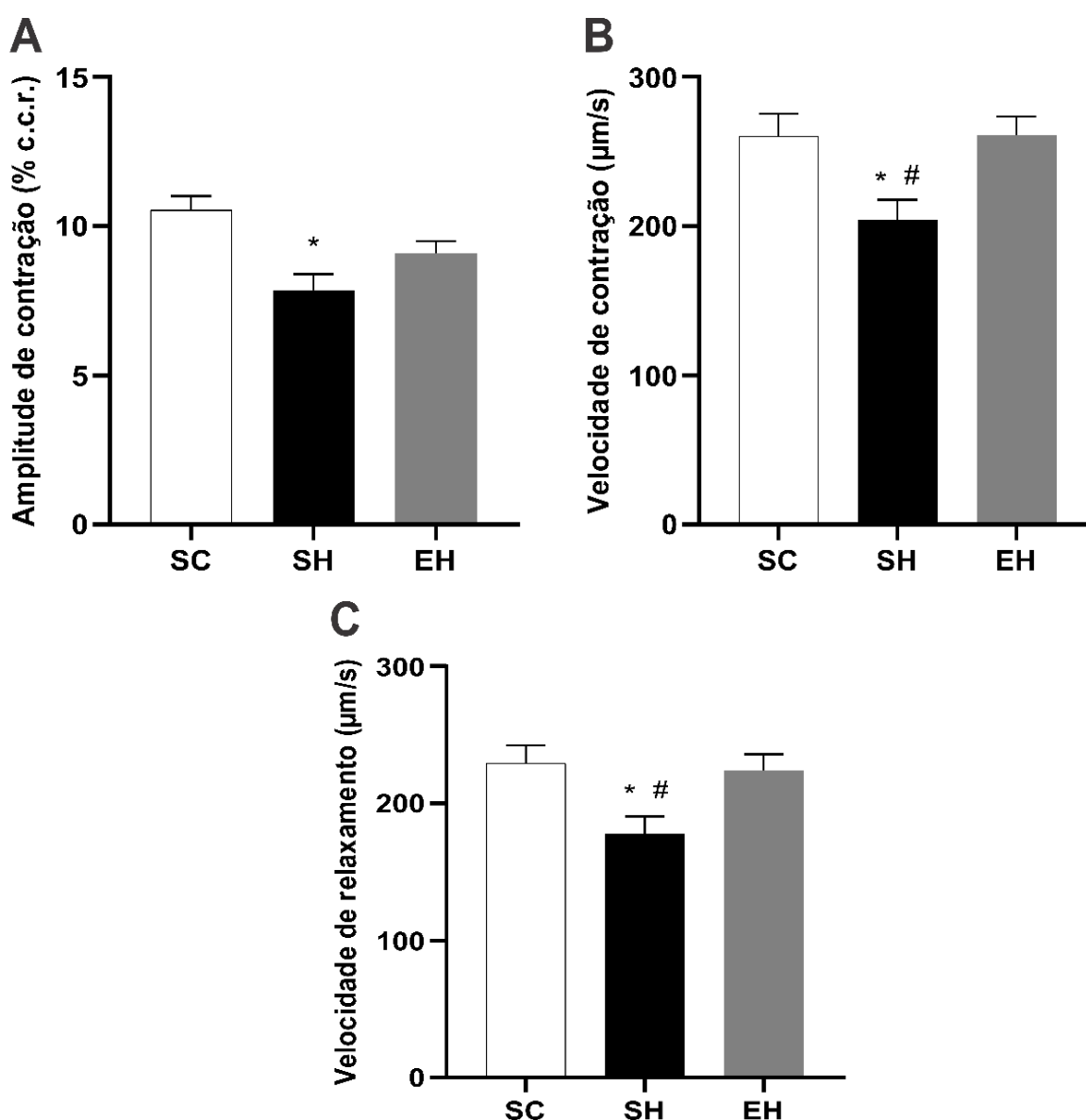
A Figura 10 mostra os dados da função sistólica do ventrículo direito avaliados pela TAPSE. No painel A encontram-se imagens ecocardiográficas representativas da TAPSE. Observou-se que no 22º dia após a aplicação da MCT (Fig. 10B) os animais do grupo SH apresentaram menores valores da TAPSE ( $p < 0,05$ ), em comparação aos dos animais do grupo SC e EH.



**Figura 10.** Função sistólica do ventrículo direito. (A) . (A) Imagem representativa da excursão sistólica do plano anular tricúspide (TAPSE). (B) Valores médios da TAPSE medida no 22º dia após injeção de MCT. Dados são médias  $\pm$  EPM de 6-7 ratos em cada grupo. SC, controle sedentário; SH, Sedentário hipertenso; EH, Exercício hipertenso. *One-Way ANOVA* seguida do teste post hoc de Tukey. \* $P < 0,05$  vs. SC; #  $P < 0,05$  vs. EH.

## 5.6. Contratilidade celular

Os parâmetros da contração dos miócitos isolados do VD, estimulados na frequência de 5 Hz, são mostrados na Figura 11. Observa-se que os animais do grupo SH apresentaram menor ( $p < 0,05$ ) amplitude de contração (SH vs. SC, Fig. 11 A), velocidade de contração (Fig. 11 B) e velocidade de relaxamento (Fig. 11 C), em comparação com as dos animais dos grupos SC e EH ( $P < 0,05$ ).



**Figura 11.** Contratilidade de miócitos isolados do ventrículo direito. (A) Amplitude de contração. (B) Velocidade de contração. (C) Velocidade de relaxamento. Os dados são média  $\pm$  EPM de 6-8 células (5-7 animais por grupo). Kruskal-Wallis, seguido de Dunn's. \* $P < 0,05$  vs. SC; #  $P < 0,05$  vs. EH.

### 5.7. Ca<sup>2+</sup> intracelular transiente

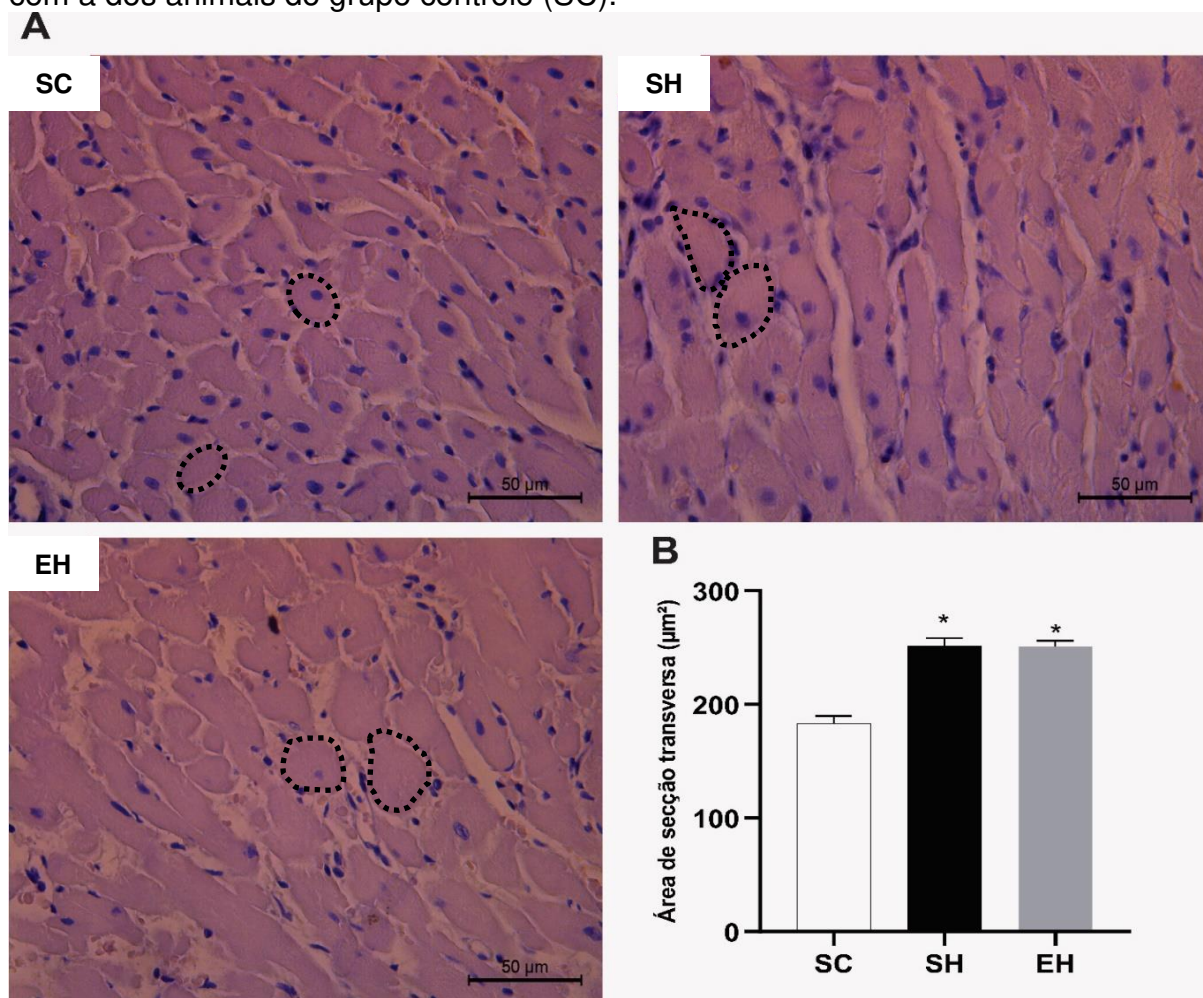
Os parâmetros do Ca<sup>2+</sup> intracelular transiente dos miócitos isolados do VD, estimulado na frequência de 5 Hz, são mostrados na Figura 12. Observa-se que os animais do grupo SH apresentaram menor amplitude (SH vs. SC, Fig. 12 A) velocidade até o pico (Fig. 12 B) e de decaimento (Fig. 12 C) do Ca<sup>2+</sup> intracelular transiente, em comparação às dos animais do grupo SC e EH (P<0,05).

**Figura 12.** Ca<sup>2+</sup> intracelular transiente em miócitos isolado do ventrículo direito. (A) Amplitude de Ca<sup>2+</sup> intracelular. (B) Velocidade até o pico do Ca<sup>2+</sup> intracelular. (C) Velocidade de decaimento do Ca<sup>2+</sup> intracelular. Os dados são média ± EPM de 6-8 células (5-7 animais por grupo). Kruskal-Wallis, seguido de Dunn's. \*P<0,05 vs. SC; # P<0,05 vs. EH.

### 5.8. Dimensões dos miócitos do ventrículo direito

#### 5.8.1. Área de secção transversa

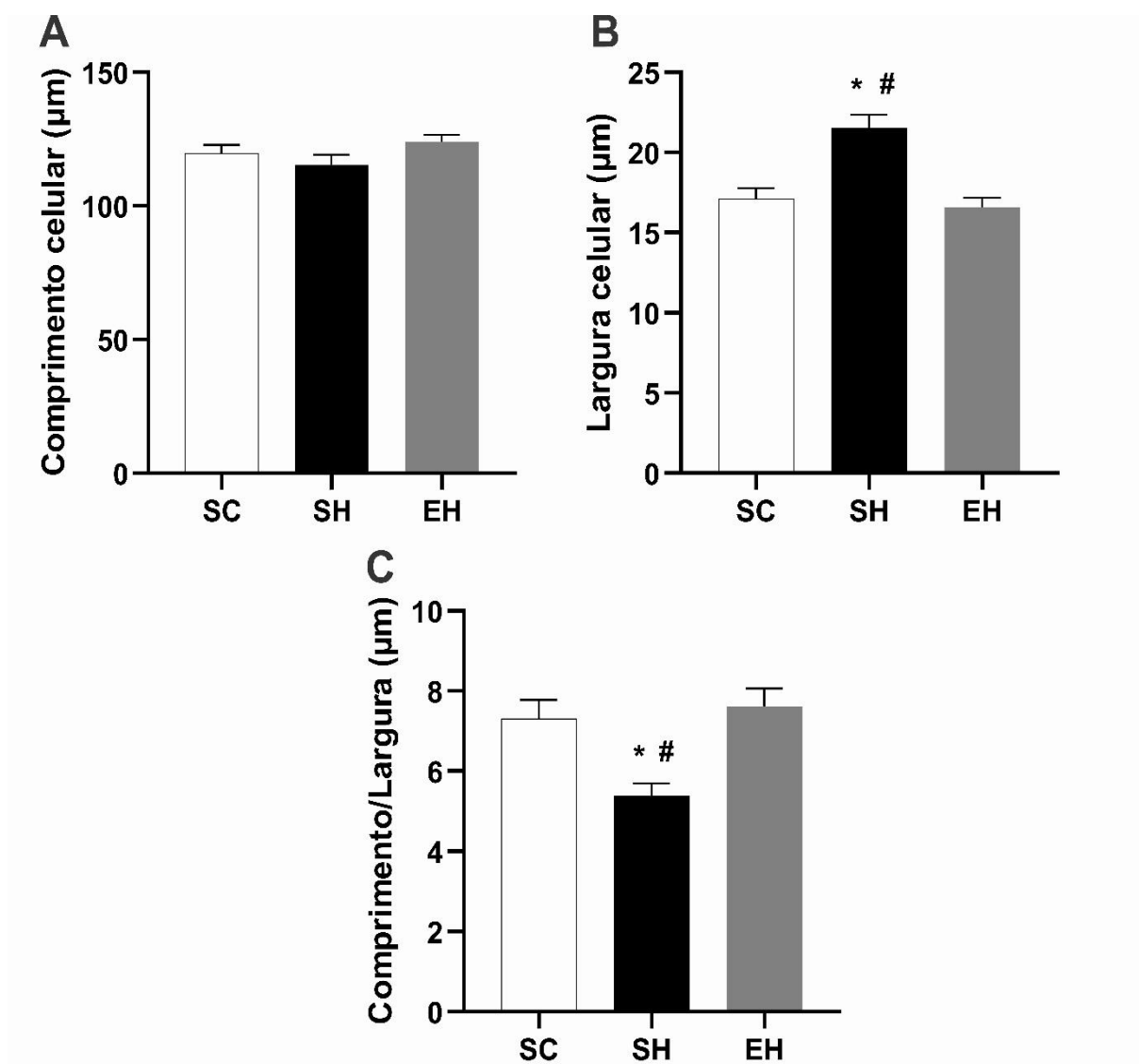
Os resultados referentes à área de secção transversa (AST) de miócitos do VD estão demonstrados na figura 13. O painel 13A apresenta fotomicrografias histológicas do VD com orientação transversal. No painel 13B, observa-se que os animais com HAP (SH e EH) apresentaram maior ( $p < 0,05$ ) AST, quando comparados com a dos animais do grupo controle (SC).



**Figura 13.** Área de secção transversa de miócitos do ventrículo direito. (A) Fotomicrografias representativas do ventrículo direito (Hematoxilina & Eosina) em corte transversal. (Pontilhado preto) representação da medida da área de secção transversa dos cardiomiócitos. SC, controle sedentário; SH, Sedentário hipertenso; EH, Exercício hipertenso. (B) Dados dos grupos. Os dados são média  $\pm$  EPM de 10 imagens por animal em cada grupo (5-6 animais por grupo). Kruskal-Wallis, seguido de Dunn's. \* $P < 0,05$  vs. SC.

### 5.8.2. Dimensões de miócitos isolados do ventrículo direito

As dimensões dos miócitos isolados do VD estão apresentadas na figura 14. Observa-se que o comprimento celular não foi diferente ( $p > 0,05$ ) entre os grupos (Fig. 14A). Entretanto, os animais do grupo SH apresentaram maior ( $p < 0,05$ ) largura celular (Fig. 14B) e menor ( $p < 0,05$ ) razão comprimento/largura (Fig. 14C), em comparação às dos animais dos grupos SC e EH.



**Figura 14.** Dimensões de miócitos do ventrículo direito. (A) Comprimento; (B) Largura; (C) Razão comprimento/largura. Os dados são média  $\pm$  EPM de 6-8 células (5-7 animais por grupo). SC, controle sedentário; SH, Sedentário hipertenso; EH, Exercício hipertenso. One-Way ANOVA seguido do teste post hoc de Tukey. \* $P < 0,05$  vs. SC; #  $P < 0,05$  vs. EH.

### 5.9. Proporções histomorfométricas entre os elementos teciduais do ventrículo direito

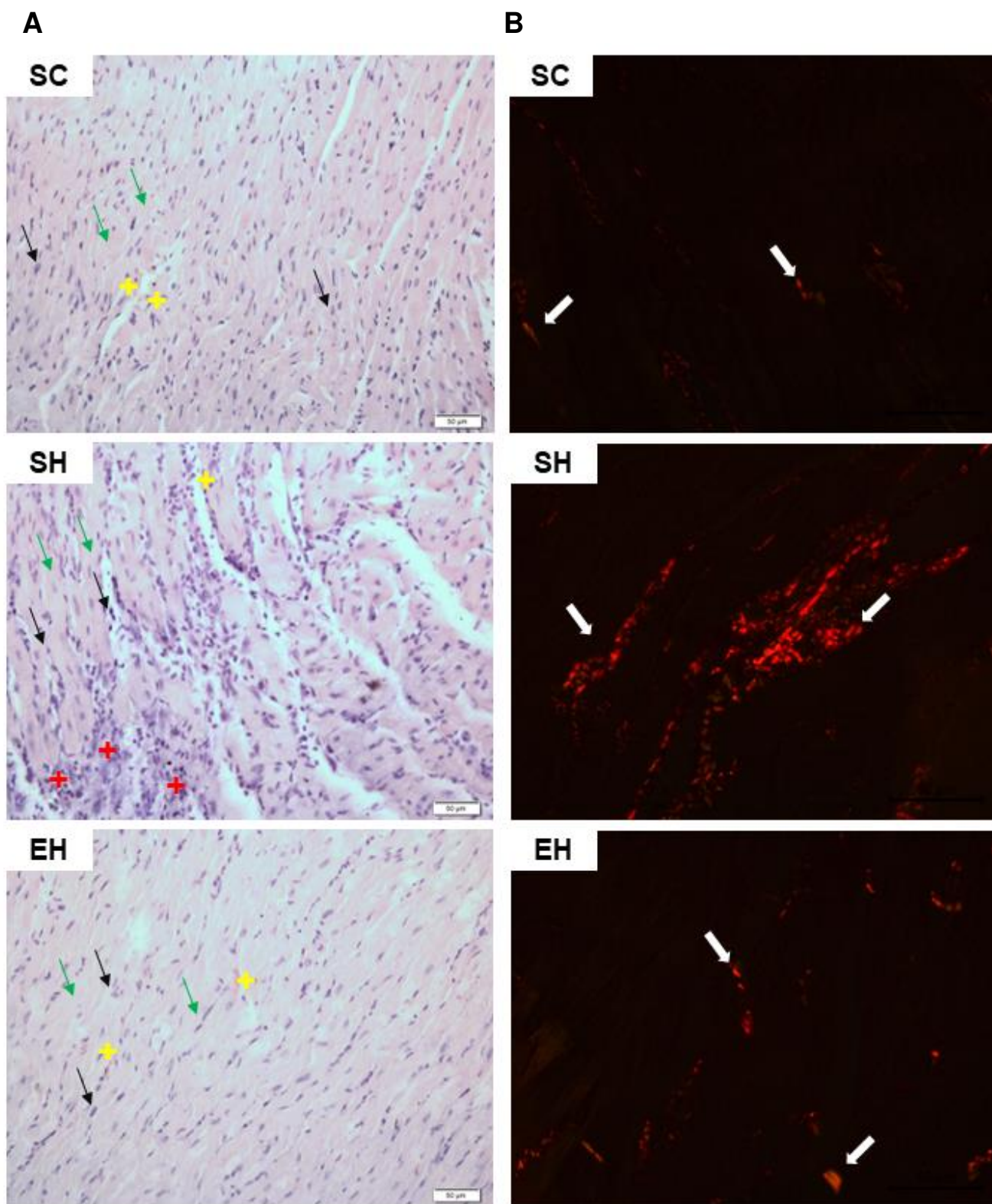
A figura 15 apresenta fotomicrografias representativas do VD. Observa-se no painel 15A que os animais dos grupos SC e EH apresentam configuração e organização tecidual normal (ex. vasos sanguíneos, núcleos) e bem definida. Diferentemente, nos animais do grupo SH é possível observar a presença de infiltrado inflamatório em algumas regiões e desorganização tecidual com excesso de matriz extracelular.

As médias por grupo dos parâmetros histomorfométricos avaliados estão apresentados na tabela 2. Observa-se que os animais do grupo SH apresentaram menor percentual de citoplasma e de cardiomiócitos; e maior percentual de vasos sanguíneos, infiltrado inflamatório e colágeno total, quando comparados aos dos animais dos grupos SC e EH ( $p < 0,05$ ). Além disso, os animais do grupo EH apresentaram menor ( $p < 0,05$ ) percentual de núcleo, em comparação ao dos animais dos grupos SC e SH.

**Tabela 2.** Proporção histomorfométrica entre os elementos teciduais do ventrículo direito.

Parâmetros	SC	SH	EH
Citoplasma (%)	88,20 ± 2,09	82,74 ± 2,06*#	90,07 ± 2,25
Núcleo (%)	10,20 ± 0,66#	11,30 ± 0,41#	7,47 ± 0,40
Vasos sanguíneos (%)	1,18 ± 0,33	2,66 ± 0,37*#	1,56 ± 0,40
Infiltrado Inflamatório (%)	0,42 ± 0,18	3,30 ± 0,97*#	0,90 ± 0,33
Colágeno total (%)	0,61 ± 0,10	2,19 ± 0,22*#	0,99 ± 0,10
Cardiomiócito (%)	98,40 ± 2,75	93,70 ± 2,47*#	97,54 ± 2,65

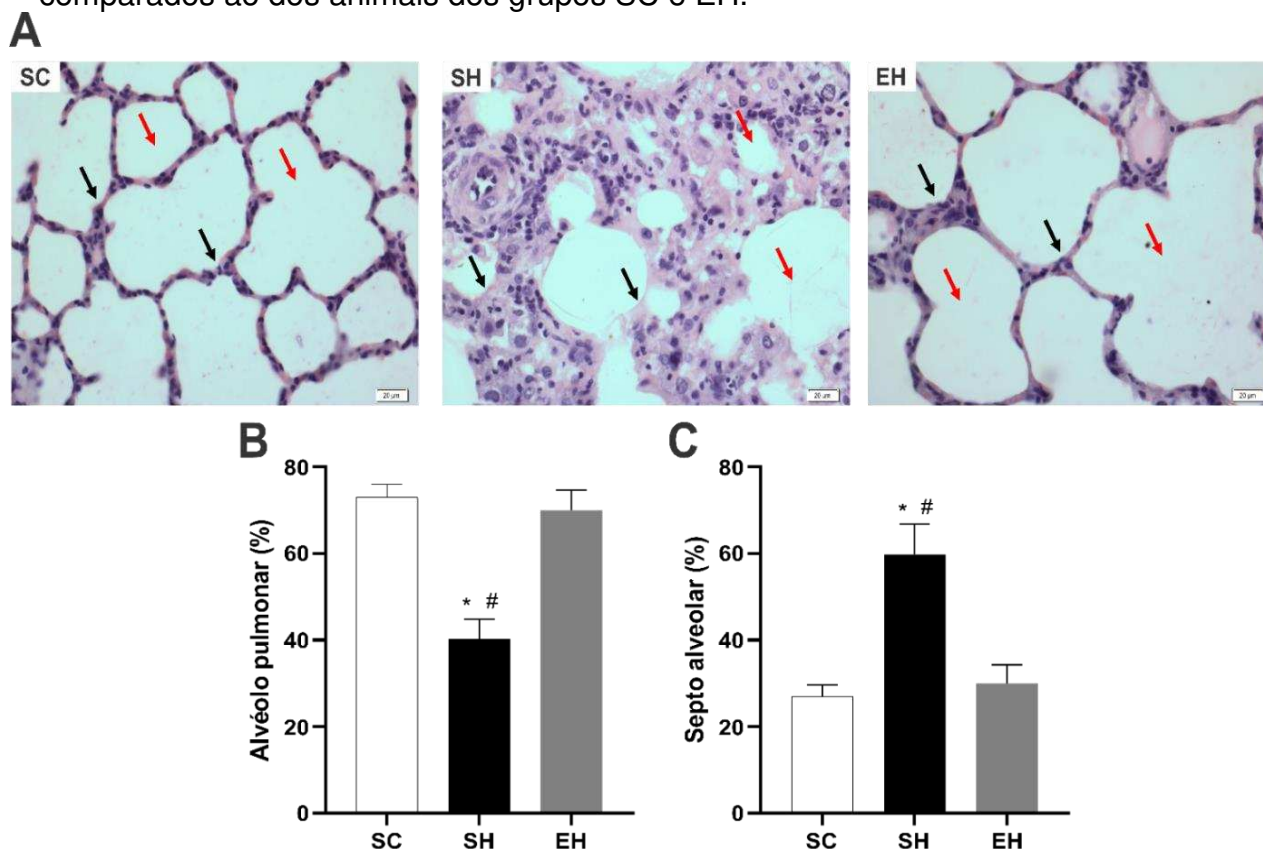
Dados são médias ± EPM de 10 imagens de 5-7 animais em cada grupo. SC, controle sedentário; SH, Sedentário hipertenso; EH, Exercício hipertenso. One-Way ANOVA seguido do teste post hoc de Tukey. \* $P < 0,05$  vs. SC; #  $P < 0,05$  vs. EH.



**Figura 15.** Fotomicrografias representativas do ventrículo direito. (A) Tecido do VD corado com H&E. Barra de escala = 50  $\mu$ m. (B) Tecido do VD corado com picrosirius red. Barra de escala = 50  $\mu$ m. Painel A: Seta verde = Citoplasma; Setas pretas = Núcleo; Asterisco amarelo = Vaso sanguíneo; Asterisco vermelho = Infiltrado inflamatório. Painel B: Seta Branca = Colágeno total.

### 5.10. Proporções histomorfométricas do pulmão direito

A figura 16 apresenta fotomicrografias representativas do pulmão direito. Observa-se no painel 16A que os animais do grupo SH apresentam microarquitetura pulmonar visivelmente diferente daquela dos animais dos grupos SC e EH. Nestes animais observou-se um aumento de septo alveolar e diminuição de alvéolos pulmonares. Estes resultados são confirmados nos painéis 16A e 16B. No painel 16B, os animais do grupo SH apresentaram menor percentual de alvéolos pulmonares, quando comparados aos animais dos grupos SC e EH. Por outro lado, no painel 16C, os animais do grupo SH apresentaram maior percentual de septo alveolar, quando comparados ao dos animais dos grupos SC e EH.



**Figura 16.** Histomorfometria do pulmão direito. (A) Fotomicrografia representativa do pulmão direito (Hematoxilina & Eosina, em corte transversal). Seta vermelha = Alvéolo pulmonar; Setas pretas = Septo alveolar. (B) Proporção de alvéolos pulmonares entre os elementos teciduais do pulmão. (C) Proporção de alvéolos pulmonares entre os elementos teciduais do pulmão. Os dados são média  $\pm$  EPM de 10 imagens por animal em cada grupo (5-6 animais por grupo). SC, controle sedentário; SH, Sedentário hipertenso; EH, Exercício hipertenso. One-Way ANOVA seguido do teste post hoc de Tukey. \* $P < 0,05$  vs. SC; #  $P < 0,05$  vs. EH.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo foram investigados os efeitos do treinamento físico combinado de intensidade moderada, composto por sessões de treinamento físico aeróbico e resistido realizadas em dias alternados durante o desenvolvimento da HAP induzida por MCT, sobre a morfologia e a função cardiopulmonar em ratos. Os principais resultados indicam que este tipo de treinamento físico aumenta a sobrevivência, a tolerância ao esforço físico (TTF e CMC relativa), mantém a função do VD (TAPSE), retarda a redução da resistência da artéria pulmonar (razão TA/TE) e a progressão dos prejuízos da HAP no pulmão (percentual de alvéolo) e na contratilidade (amplitude de contração, velocidade de contração e de relaxamento) e  $Ca^{2+}$  intracelular transiente (amplitude do  $Ca^{2+}$  intracelular transiente, velocidade até o pico e de decaimento) de miócitos isolados do VD.

### 6.1. Sobrevivência e tolerância ao esforço físico

O treinamento físico combinado, composto por sessões de treinamento aeróbico e resistido tem sido recomendado como uma importante ferramenta não farmacológica na prevenção e/ou atenuação de diversos fatores de risco para doenças cardiovasculares e metabólicas [93, 102, 103].

No presente estudo observou-se que os animais com HAP apresentaram menor tolerância ao esforço físico aeróbico e resistido, em comparação aos animais do grupo SC. Por outro lado, os animais do grupo EH apresentaram maior tolerância ao esforço físico, em comparação aos animais dos grupos SH e SC ao longo do período experimental, mostrando os benefícios do modelo de treinamento físico aqui empregado na melhora da tolerância ao esforço físico. Resultados semelhantes foram encontrados em outro estudo recente com o treinamento aeróbico realizado de forma isolada [73]. Neste estudo os animais com HAP (60 mg/kg) treinados foram capazes manter a tolerância ao esforço físico ao longo do protocolo de treinamento físico, todavia animais com HAP sedentários reduziram de forma significativa a tolerância ao esforço físico, corroborando com os resultados aqui encontrados. Quanto ao treinamento físico resistido, em um estudo realizado recentemente por Portes [82] os animais com HAP (60mg/kg) que foram submetidos a este treinamento foram capazes de aumentar a força muscular (Carga máxima carregada) ao longo do período

experimental, já os animais com HAP sedentários tiveram valores de força muscular inferiores aos observados nos animais exercitados com HAP. Esse aumento na tolerância ao esforço físico pode estar relacionado às alterações promovidas pelo exercício físico na musculatura esquelética, que não foram avaliadas no presente estudo. No entanto, no estudo de Moreira-Goncalves et al. [70] verificou-se que o treinamento aeróbico contínuo foi capaz de promover benefícios na musculatura esquelética, evitando principalmente a perda da função muscular em animais com HAP (60 mg/kg) induzida por MCT. No estudo de Portes [82] o treinamento resistido prévio (escada vertical), impediu a redução da AST e a redução da massa muscular do músculo do bíceps braquial em animais com HAP (60 mg/kg) induzida por MCT.

Além disso, as melhorias na função cardiopulmonar (Itens: 6.2 e 6.3) observadas no presente estudo também podem ter contribuído para o aumento e/ou manutenção da tolerância ao esforço físico nos animais do grupo EH. Por outro lado, os prejuízos na função cardiopulmonar e muscular esquelética causados pela MCT podem ter contribuído para a diminuição da tolerância ao esforço físico observada nos animais do grupo SH.

Quanto à sobrevivência, o treinamento físico combinado aplicado no presente estudo aumentou a sobrevivência dos animais do grupo EHS, indicando efeitos benéficos do treinamento físico na sobrevivência destes animais. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos realizados com treinamento físico aeróbico [71, 72] e resistido [74] neste modelo de HAP. Diversos fatores podem ter contribuído para o aumento da sobrevivência dos animais exercitados, dentre eles destacam-se, melhoria na função [71, 104] e na estrutura do miocárdio [70, 104] que favorece o débito cardíaco. Além disso, todas as melhoras celulares, hemodinâmicas e histológicas que serão discutidas adiante (Itens: 6.2; 6.3; 6.4 e 6.5) também podem ter contribuído para esse aumento da sobrevivência dos animais exercitados com HAP.

## **6.2. Peso corporal, dos órgãos e morfometria do ventrículo direito**

No presente estudo verificou-se que os animais que receberam MCT (SH e EH) apresentaram menor peso corporal ao final do experimento, em comparação aos animais controle. O treinamento físico combinado empregado não foi capaz de prevenir a redução do peso corporal característica deste modelo de HAP (60 mg/kg).

Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos que usaram o mesmo modelo [40, 54]; e que o treinamento físico aeróbico realizado em esteira não alterou esse padrão do peso corporal [105]. Essa diminuição no peso corporal dos animais com HAP ocorre devido à toxicidade hepática gerada pela MCT, nas primeiras semanas de aplicação, o que prejudica o metabolismo hepático. Dessa forma, com a progressão da doença há um comprometimento da capacidade ventilatória dos animais que contribui para uma redução do peso corporal dos animais [98].

Outra possível explicação para diminuição do peso corporal dos animais com HAP, pode estar relacionada à redução no consumo de alimento destes animais. Apesar do presente estudo não ter monitorado o consumo de ração, um estudo recente mostra que ratos injetados com MCT (40mg/kg) apresentam diminuição no consumo de ração e, conseqüentemente, menor peso corporal ao final do experimento, quando comparados aos animais controles [106].

Além disso, nos ratos com HAP que foram submetidos ao treinamento físico combinado (EH), o próprio treinamento físico pode contribuir para essa diminuição do peso corporal dos animais. Estudos, em ratos tem mostrado que tanto o treinamento aeróbico quanto o treinamento resistido promovem a perda de peso corporal [107, 108].

Observou-se também que os animais com HAP apresentaram hipertrofia cardíaca e ventricular direita, demonstradas pelo aumento das respectivas razões (peso do coração/comprimento tíbia; peso do VD/comprimento da tíbia), quando comparados aos animais do grupo SC. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que utilizaram este modelo de MCT (60 mg/kg) para indução da doença [109, 110]. A hipertrofia cardíaca causada pela HAP ocorre em razão do mecanismo adaptativo do VD, que busca manter sua função apesar da elevada resistência da artéria pulmonar, que provoca aumento da pós-carga no VD [70]. No entanto, essa hipertrofia gradual do VD leva à redução na fração de ejeção e diminuição do débito cardíaco gerando hipertrofia patológica do VD [5]. Estes achados são compatíveis com os resultados referentes à hemodinâmica cardíaca no presente estudo (Item: 6.3), onde houve aumento da resistência da artéria pulmonar estimado pela redução da razão TA/TE, alteração na morfologia dos cardiomiócitos (aumento da largura e redução da razão comprimento/largura dos miócitos isolados do VD) (Item: 6.5.1) e, conseqüentemente, prejuízos na função do VD (Item 6.3; redução da TAPSE) no grupo SH.

Entretanto, o treinamento físico combinado aplicado foi capaz de prevenir a hipertrofia cardíaca e do VD nos animais do grupo EH. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos em modelos de HAP (60 mg/kg) com o treinamento físico aeróbico [72, 73] e resistido [82] realizados de forma isolada. Estudos mostram que o treinamento físico é capaz de combater o remodelamento patológico do VD por meio da diminuição dos níveis circulantes e teciduais de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e caspase-3, além da expressão de receptores do fato indutor de necrose tumoral (TWEAK), que são responsáveis pelo aumento de radicais livres, processos pró-inflamatórios e apoptóticos no VD de animais com HAP induzida por MCT [111]. De fato, no presente estudo observou-se que os animais do grupo EH apresentaram redução da resistência da artéria pulmonar, estimada pela razão TA/TE (Item: 6.3), o que pode ter atenuado o remodelamento adverso do VD, em função de uma menor sobrecarga pressórica e preservação da função sistólica [5].

A MCT também aumentou os pesos absoluto e relativo (razão peso do pulmão/massa corporal) do pulmão (SC vs. SH) nos animais dos grupos SH e EH. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo realizado por Silva et al. [73]. Esse aumento de peso do pulmão pode estar relacionado ao remodelamento vascular adverso observado no presente estudo (Item: 6.6), o que prejudica a circulação pulmonar. Além disso, segundo Wang et al. [112], o aumento do peso pulmonar na HAP está associado ao aumento da parede alveolar e, conseqüentemente, diminuição de alvéolos pulmonares. Ademais, apesar de não ter sido analisado no presente estudo o aumento no conteúdo de água no pulmão, também pode ter contribuído para esse aumento no peso do pulmão, como observado em outros estudos com o mesmo modelo de HAP induzido por MCT (60 mg/kg) [35, 113].

Por outro lado, o treinamento físico combinado foi capaz de atenuar o aumento dos pesos absoluto e relativo do pulmão. Esse resultado indica que o treinamento físico pode causar redução da parede alveolar (Item: 6.6) e, assim, promover benefícios ao pulmão por melhorar a funcionalidade do mesmo [73].

### **6.3. Hemodinâmica**

Sabe-se que a capacidade do VD em se adaptar ao aumento crônico da resistência vascular pulmonar é um fator determinante da capacidade funcional e da sobrevida dos pacientes com HAP [114]. Observou-se no presente estudo que no 22<sup>o</sup>

dia após a aplicação da MCT, os animais do grupo SH apresentaram aumento na resistência da artéria pulmonar, estimada pela diminuição da razão TA/TE. Este resultado indica a eficácia do modelo de HAP induzida por MCT, pois o aumento da resistência vascular pulmonar é uma das principais características da doença e um fator determinante para o remodelamento adverso do VD [4]. Segundo Crosswhite e Sun [37], este aumento da resistência vascular pulmonar na HAP, ocorre devido a um desequilíbrio entre os fatores vasoconstritores e vasodilatadores endoteliais. Dentre os fatores vasodilatadores que estão reduzidos na HAP destacam-se o ON e os prostanoídes. Quanto aos vasoconstritores aumentados na HAP e que contribuem para a remodelação vascular pulmonar, destacam-se a endotelina-1 e o tromboxano [37].

Entretanto, o treinamento físico combinado foi capaz de retardar o aumento da resistência da artéria pulmonar estimada pela razão TA/TE nos animais do grupo EH. Esse resultado indica o benefício do treinamento físico combinado composto por sessões de treinamento físico aeróbico e resistido na redução da sobrecarga no VD. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos com o modelo de HAP induzida por MCT (60 mg/kg) com o treinamento aeróbico e resistido realizados de forma isolada [72-74, 82]. Essa atenuação do aumento da resistência da artéria pulmonar pode estar relacionada ao aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico que é um potente vasodilatador gerado pelo exercício físico em função do aumento do estresse por cisalhamento [115]. Dessa forma, acredita-se que os benefícios do treinamento físico combinado sobre a razão TA/TE podem estar relacionados à maior síntese de óxido nítrico na circulação pulmonar. Ademais, o atraso no remodelamento patológico nos animais que foram submetidos ao treinamento físico combinado observadas no presente estudo e as melhoras morfométricas (Item: 6.2) e histomorfométricas cardíacas (Item: 6.5), também podem ter contribuído para melhora da função cardíaca nesses animais.

A HAP causou redução da função sistólica do VD, determinada pela TAPSE (grupo SH < grupo SC). O treinamento físico combinado aplicado foi capaz de atenuar essa redução. Estudos têm mostrado que prejuízos na TAPSE podem estar associados a uma redução do volume de ejeção que, conseqüentemente, causa uma diminuição do débito cardíaco e do fluxo sanguíneo pulmonar e sistêmico [47, 48]. Além disso, as alterações morfométricas como, redução da quantidade de miócitos e aumento da matriz extracelular causadas pela HAP no VD influenciam diretamente na

redução da função sistólica do VD prejudicando, assim, toda a mecânica contrátil [116]. Esses dados estão de acordo com os dados de morfometria (Item: 6.2) e histomorfometria (Item: 6.5) observados do presente estudo. Observou-se que os animais com HAP apresentaram hipertrofia patológica do VD, demonstrada pelo aumento das razões peso do coração/comprimento tibia e peso do VD/comprimento da tibia, redução no percentual de cardiomiócitos, aumento no percentual de infiltrado inflamatório e de colágeno total.

Quanto à melhora da função sistólica do VD em resposta ao treinamento combinado observada nos animais do grupo EH, esta pode estar relacionada à redução da resistência da artéria pulmonar, demonstrada pelo aumento da razão TA/TE, além da diminuição do remodelamento adverso do VD em função de uma menor sobrecarga pressórica e menores prejuízos à função sistólica [5]. Esses resultados estão relacionados aos obtidos nas análises morfométricas (Item: 6.2) e histomorfométricas cardíacas (Item: 6.5), onde o exercício físico combinado foi capaz de atenuar a hipertrofia patológica do VD.

#### **6.4. Contratilidade celular e $Ca^{2+}$ intracelular transiente**

A HAP induzida por MCT (60 mg/kg) promoveu diminuição da amplitude e da velocidade de contração e relaxamento, bem como da amplitude e das velocidades até o pico e de decaimento do  $Ca^{2+}$  intracelular transiente em miócitos isolados do VD dos ratos do grupo SH, comparados aos dos animais do grupo SC. Estes resultados indicam que a eficiência mecânica dos cardiomiócitos estava prejudicada nos ratos injetados com MCT. Em consonância com estes achados em nível celular, a função do VD estava prejudicada pois estes apresentaram redução na TAPSE e aumento da resistência da artéria pulmonar (redução na TA/TE).

Essa redução na amplitude de encurtamento celular também foi observada em outros estudos realizados com este modelo de HAP induzida por MCT. [72, 73]. Há evidências [117, 118] que a redução da amplitude de encurtamento celular pode estar relacionada à diminuição da sensibilidade dos miofilamentos contráteis ao  $Ca^{2+}$ , redução do conteúdo de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático e redução do  $Ca^{2+}$  intracelular transiente. De fato, no presente estudo a amplitude do  $Ca^{2+}$  intracelular transiente foi reduzida no grupo SH. Todavia, isso não indica redução na sensibilidade dos miofilamentos contráteis ao  $Ca^{2+}$ , uma vez que a amplitude de contração celular

também estava reduzida. Estudos que avaliem sensibilidade dos miofilamentos contráteis ao  $\text{Ca}^{2+}$  e redução do conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático nesse modelo de HAP podem contribuir para o avanço neste tema.

A redução das velocidades de contração e até o pico do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente estão associadas principalmente ao atraso na liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RS) via receptor de rianodina 2 (RyR2) [119]. A diminuição das velocidades de relaxamento celular e de decaimento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente estão relacionadas principalmente à diminuição da recaptção do  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol para o RS via SERCA2a ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do RS) que é fosforilada pela PLB (fosfolambam) [119]. Apesar destas proteínas reguladoras do  $\text{Ca}^{2+}$  não terem sido analisadas no presente estudo, a literatura tem mostrado que a expressão das proteínas SERCA2a e RyR2 está reduzida no VD de animais com HAP induzida por MCT [70, 120].

Por outro lado, o treinamento físico combinado aplicado foi capaz de prevenir a diminuição da amplitude de contração celular no grupo EH. Além disso, promoveu manutenção das velocidades de contração e de relaxamento celular, assim como das velocidades até o pico e de decaimento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente. Isto indica que o modelo de treinamento físico usado foi capaz de promover benefícios na função contrátil de miócitos isolados do VD dos animais com HAP induzida por MCT. Em concordância com estes achados em nível celular, a função do VD destes ratos foi preservada, pois estes animais apresentaram manutenção da TAPSE e prevenção do aumento da resistência da artéria pulmonar.

Esses efeitos do treinamento combinado podem estar relacionados à prevenção da deterioração da expressão e ou atividade de proteínas reguladoras do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, embora estas proteínas não tenham sido analisadas no presente estudo. Porém, estudos prévios demonstram que o treinamento aeróbico de intensidade moderada em esteira rolante causou aumento na expressão de SERCA2a e RyR2 no VD de ratos com HAP induzida por MCT [70, 120]. Além disso, foi demonstrado que o treinamento resistido também é capaz de aumentar a expressão de SERCA2a no ventrículo esquerdo (VE) de ratos [121]. Estas proteínas são responsáveis pela liberação (RyR2) e recaptção (SERCA2a) de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático e influenciam diretamente as velocidades de contração e de relaxamento celular, assim como as velocidades até o pico e de decaimento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente, respectivamente. Assim, estudos que avaliem os efeitos do treinamento físico combinado sobre as proteínas reguladoras do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular em

ratos com HAP induzida por MCT poderão contribuir para uma melhor compreensão destes fenômenos.

## **6.5. Histofometria do ventrículo direito**

### **6.5.1. Dimensões dos miócitos**

Outro importante parâmetro para avaliação da hipertrofia cardíaca é a morfologia dos cardiomiócitos [122]. No presente estudo, os animais com HAP tiveram um aumento da largura, da razão comprimento/largura celular dos miócitos isolados e da área de secção transversa (observada em cortes histológicos). Essas alterações encontradas nos miócitos isolados do VD, são características da hipertrofia concêntrica, patológica, que ocorre devido a uma resposta adaptativa do VD [5]. Além disso, estes resultados estão de acordo com as hipertrofias cardíaca e ventricular, patológica, observadas nos animais do grupo SH, estimada pelo aumento do peso do coração, VD e suas respectivas razões, respectivamente. Sabe-se que este remodelamento patológico do VD é característico do modelo de HAP induzida por MCT e está relacionado prejuízo na regulação da cascata de sinalização de hipertrofia fisiológica fosfoinosítide - 3 - quinase (PI3K) / proteína quinase B (Akt) / alvo da rapamicina (mTOR) em mamíferos, ao aumento do percentual de colágeno e ao aumento da resistência da artéria pulmonar estimada pela razão TA/TE, conforme demonstrado no presente estudo (Item: 6.14) e em estudos anteriores [70, 123-125].

Em contrapartida, o treinamento físico combinado foi capaz de prevenir a hipertrofia de cardiomiócitos causada pela HAP. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos com o treinamento aeróbico [73, 82] e resistido [73, 82] no mesmo modelo usado no presente estudo (60 mg/kg). Esse resultado pode ser explicado pela diminuição da resistência da artéria pulmonar observada no presente estudo que, conseqüentemente leva a uma redução da sobrecarga ao VD. Esta redução da sobrecarga no VD por sua vez, contribui para atenuação do remodelamento adverso nesse tecido com diminuição de fibrose intersticial, e conseqüentemente preservação da função contrátil [5].

Por outro lado, o treinamento físico combinado foi capaz de prevenir a diminuição na porcentagem de cardiomiócitos, mas não foi capaz de diminuir a área de secção transversa dos miócitos isolados do VD. Em relação a área de secção

transversa, este foi um resultado inesperado pois devido a todas as melhoras hemodinâmicas, estruturais celulares e extracelulares observadas, esperava-se que houvesse também uma redução neste parâmetro. Porém, resultados semelhantes foram encontrados em outros estudo com essa dosagem de 60 mg/kg de peso corporal, onde os animais em falha cardíaca que realizaram o treinamento aeróbico também apresentaram um aumento na área de secção transversa [72].

### **6.5.2. Estruturas celulares e extracelulares do ventrículo direito**

Observou-se no presente estudo que os animais com HAP tiveram uma redução no percentual de cardiomiócitos e citoplasma, além de um aumento no percentual de vasos sanguíneos, infiltrado inflamatório e colágeno total. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que utilizaram aplicação de MCT (60 mg/kg) para indução da doença [109, 110]. Todas essas alterações são indicativos de remodelamento adverso do VD e acúmulo de fibrose que tem um impacto negativo na função cardíaca, aumentando a rigidez cardíaca, promovendo arritmias e prejuízos na difusão de oxigênio para os cardiomiócitos [53, 73].

Em relação à diminuição do percentual de cardiomiócitos e aumento do percentual de infiltrado inflamatório, resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos com HAP (60 mg/kg) em modelo animal [82, 104]. Este resultado pode estar relacionado ao estado de falha cardíaca observado nos estágios mais avançados da HAP no modelo animal principalmente quando utilizado uma dosagem mais severa (60 mg/kg) para indução da doença.

Sabe-se que no estágio de falha cardíaca há um aumento do estresse oxidativo e do estado inflamatório e conseqüentemente aumento de citocinas pró-inflamatórias/apoptóticas, como por exemplo o TNF- $\alpha$  que, conseqüentemente, contribuem para diminuição de cardiomiócitos e aumento de infiltrado inflamatório [126].

Quanto ao aumento no percentual de colágeno total encontrado no presente estudo e em outros [72, 73], isso ocorre devido ao aumento da expressão gênica e proteica de colágeno tipo I e II, que causa uma diminuição da função contrátil do VD tornando-o mais rígido [127, 128]. Além disso, estudos tem mostrado que a hipertrofia patológica do VD observada na HAP pode causar apoptose e fibrose no miocárdio, comprometendo assim a função cardiopulmonar [4, 104]. Adicionalmente, os prejuízos

causados pela HAP na hemodinâmica cardíaca (aumento da resistência da artéria pulmonar e diminuição da TAPSE;Item:6.3) e na dimensão dos miócitos isolados do VD (Item: 6.5.1) contribuem para esse remodelamento patológico do VD.

Todavia, o treinamento físico combinado foi capaz de prevenir o remodelamento patológico do VD (aumento no percentual de citoplasma, cardiomiócito, redução no percentual de infiltrado inflamatório e colágeno total). Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos com o treinamento aeróbico e resistido realizados de forma isolada. Estudos tem mostrado que, em nível tecidual essa diminuição da hipertrofia patológica do VD no treinamento aeróbico em esteira de baixa e moderada intensidade, tem sido associada a redução da deposição de colágeno e fibrose cardíaca e decréscimo na relação de miosinas de cadeia pesada beta e alfa (B/aMCP), além disso o exercício é capaz de melhorar as respostas inflamatórias quem tem um impacto significativo na função ventricular e melhora da função cardiopulmonar [104, 129]. Segundo Moreira-Gonçalves et al. [70], o exercício físico aeróbico (esteira) também possui um efeito anti-fibrótico, e é capaz de reduzir os níveis de mRNA da ET-1 e VEGF no VD, que são fatores que contribuem para redução da deposição de colágeno e apoptose no VD em animais com HAP induzida por MCT (60 mg/kg). Ademais, estudos com humanos com HAP também tem mostrado que o exercício aeróbico (ciclismo) pode modular subgrupos de linfócitos T circulantes e melhorar o perfil alterado de citocinas circulantes, além de não agravar o estado inflamatório destes indivíduos [130, 131]. Além disso, as melhoras encontradas em animais que se exercitaram (EH), tanto na hemodinâmica cardíaca (redução da resistência na artéria pulmonar e prevenção dos prejuízos da TAPSE; Item: 6.3) quanto na dimensão dos miócitos isolados do VD, podem ter contribuído para atenuação do remodelamento patológico do VD.

### **6.5.3. Histomorfometria do pulmão direito**

No presente estudo, foram analisados os percentuais de alvéolos e septo alveolar. A MCT aumento o percentual de septo alveolar e, conseqüentemente, promoveu uma diminuição do percentual de alvéolos pulmonares. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos neste modelo de HAP. Por

exemplo, no estudo realizado por Silva et al. [73] o pulmão direito dos ratos com HAP (60 mg/kg) apresentaram, dentre outras alterações, ruptura do bronquíolo e espaçamento do lúmen do alvéolo, bem como aumento do septo alveolar. No estudo realizado por Portes [82], verificou-se que animais com HAP (60 mg/kg) apresentaram aumento no percentual de alvéolos colapsados e presença de hemorragia nos alvéolos. Estas alterações encontradas no pulmão são indicativos de remodelação pulmonar patológica e estão de acordo com outros estudos [73, 82, 132]. Segundo Tuder et al. [132], este remodelamento patológico do pulmão contribui para o aumento da pressão no sistema pulmonar e, conseqüentemente, para o remodelamento da artéria pulmonar e aumento da sua resistência ao fluxo sanguíneo, resultado também encontrado no presente estudo (Item: 6.3). Ademais, estudos tem mostrado que o aumento da resistência e complacência da artéria pulmonar leva ao aumento da proliferação de células musculares lisas na artéria pulmonar e/ou células endoteliais resultando na obstrução do fluxo sanguíneo nesta artéria, o que compromete a função cardiopulmonar [133, 134]. Além disso, o remodelamento adverso do pulmão pode estar relacionado ao aumento da inflamação e do estresse oxidativo, que também são características observadas no modelo de HAP induzida por MCT [40, 49, 135, 136].

Por outro lado, os efeitos do treinamento físico na vasculatura pulmonar ainda são inconclusivos. Estudos com modelos experimentais de HAP induzida por MCT (40-60 mg/kg) mostram que o treinamento físico pode melhorar [53, 54, 73, 82] manter [105, 123] ou agravar as disfunções da vasculatura pulmonar causados pela doença [35]. Porém, no presente estudo o treinamento físico combinado foi capaz de prevenir o aumento do percentual de septo alveolar e, conseqüentemente, preservar o percentual de alvéolos. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos em animais com HAP induzida por MCT, onde os treinamentos aeróbico [73] e resistido [82] foram realizados de forma isolada.

No estudo realizado por Silva et al. [73] verificou-se que treinamento físico aeróbico contínuo de intensidade moderada foi capaz prevenir o espaçamento do lúmen alveolar e a redução no percentual de colágeno tipo I e total em animais com HAP induzida por MCT (60 mg/kg). Em estudo com o treinamento resistido prévio realizado em escalada vertical [82], observou-se que este modelo de exercício aumenta a porcentagem de alvéolos pulmonares e reduz a porcentagem de alvéolos hemorrágicos. Os mecanismos pelos quais o exercício físico aeróbico, resistido e combinado melhoram a função pulmonar neste modelo de HAP ainda não estão bem

descritos na literatura. Porém, no estudo Colombo et al. [123] verificou-se que o treinamento físico aeróbico aumenta a sinalização de  $H_2O_2$  / VEGF / p-Akt para a angiogênese pulmonar em animais com HAP induzida por MCT (60 mg/kg), melhorando, assim, a função pulmonar. Dessa forma, há necessidade de novos estudos com o treinamento físico, seja ele aeróbico, resistido ou combinado, para avaliação dos mecanismos envolvidos na melhora da função pulmonar.

## 7.CONCLUSÃO

O treinamento físico combinado de intensidade moderada, composto por sessões de treinamento físico aeróbico e resistido realizadas em dias alternados durante o desenvolvimento da HAP induzida por MCT em ratos, previne o aumento da resistência da artéria pulmonar, a disfunção sistólica e o remodelamento adverso do VD e do pulmão direito, além de promover benefícios sobre a contração e o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente de miócitos isolados do VD. Acredita-se que estes resultados possuem relevância clínica, pois indicam que o programa de treinamento físico combinado proporciona melhora da tolerância ao esforço físico e na sobrevivência dos ratos com HAP induzida por MCT. Juntos, estes resultados sugerem que este modelo de treinamento poderia ser testado em humanos.

## 8.REFERÊNCIAS

1. Galiè, N., 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)*. 2016. **37**(1): p. 67-119.
2. Condon, D.F., et al., *The 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension: what's old is new*. 2019. **8**.
3. Montani, D., et al., *Pulmonary arterial hypertension*. 2013. **8**(1): p. 1-28.
4. Ryan, J.J. and S.L.J.C.r. Archer, *The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure*. 2014. **115**(1): p. 176-188.
5. Ryan, J.J., et al., *Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension*. 2015. **31**(4): p. 391-406.
6. Leopold, J.A. and B.A.J.I.j.o.m.s. Maron, *Molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension*. 2016. **17**(5): p. 761.
7. Türck, P., et al., *Blueberry extract improves redox balance and functional parameters in the right ventricle from rats with pulmonary arterial hypertension*. 2022. **61**(1): p. 373-386.
8. Malenfant, S., et al., *Impaired skeletal muscle oxygenation and exercise tolerance in pulmonary hypertension*. 2015. **47**(11): p. 2273-2282.
9. Marra, A., et al., *Pulmonary arterial hypertension-related myopathy: an overview of current data and future perspectives*. 2015. **25**(2): p. 131-139.
10. Humbert, M., et al., *Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry*. 2006. **173**(9): p. 1023-1030.
11. Badesch, D.B., et al., *Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry*. 2010. **137**(2): p. 376-387.
12. Turck, P., *Efeitos do extrato de mirtilo em modelo de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina*. 2019.
13. SP, G.J.L., Rubin L.J. *Primary pulmonary hypertension*. 1998. **352**: p. 719-725.
14. Barst, R.J., et al., *Updated evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension*. 2009. **54**(1\_Supplement\_S): p. S78-S84.
15. Badesch, D.B., et al., *Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension*. 2009. **54**(1\_Supplement\_S): p. S55-S66.
16. Bossone, E., et al., *Echocardiographic features of primary pulmonary hypertension*. 1999. **12**(8): p. 655-662.
17. Forfia, P.R., et al., *Tricuspid annular displacement predicts survival in pulmonary hypertension*. 2006. **174**(9): p. 1034-1041.
18. Ueti, O., et al., *Assessment of right ventricular function with Doppler echocardiographic indices derived from tricuspid annular motion: comparison with radionuclide angiography*. 2002. **88**(3): p. 244-248.
19. Habib, G. and A.J.E.R.R. Torbicki, *The role of echocardiography in the diagnosis and management of patients with pulmonary hypertension*. 2010. **19**(118): p. 288-299.

20. Ota-Arakaki, J.S., F.T.A.F. Campos, and R.J.J.B.d.P. Souza, *Dia mundial da hipertensão pulmonar: reflexões e planejamentos*. 2021, SciELO Brasil.
21. Gu, S., H. Hu, and H. Dong, *Systematic Review of the Economic Burden of Pulmonary Arterial Hypertension*. *PharmacoEconomics*, 2016. **34**(6): p. 533-550.
22. Rich, S., et al., *Primary pulmonary hypertension: a national prospective study*. 1987. **107**(2): p. 216-223.
23. Ogawa, A., K. Ejiri, and H.J.L.s. Matsubara, *Long-term patient survival with idiopathic/heritable pulmonary arterial hypertension treated at a single center in Japan*. 2014. **118**(2): p. 414-419.
24. Hoeper, M.M., et al., *Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension*. 2014. **42**: p. 55-66.
25. Kodur, S., et al., *Influence of age on outcome in patients with pulmonary arterial hypertension*. 2015. **24**(7): p. 719-723.
26. McGoon, M.D., et al., *Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries*. 2013. **62**(25S): p. D51-D59.
27. Manes, A., et al., *Female gender and pulmonary arterial hypertension: a complex relationship*. 2012. **13**(6): p. 448-460.
28. Alves Jr, J.L., et al., *Pulmonary arterial hypertension in the southern hemisphere*. 2015. **147**(2): p. 495-501.
29. Maarman, G., et al., *A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet?* 2013. **3**(4): p. 739-756.
30. Gomez-Arroyo, J.G., et al., *The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective*. 2012. **302**(4): p. L363-L369.
31. Gewehr, D.M., et al., *Lesões Plexiformes em Modelo Experimental de Hipertensão Arterial Pulmonar Induzida por Monocrotalina*. 2020. **115**: p. 480-490.
32. Thenappan, T., et al., *Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management*. 2018. **360**.
33. Hill, N.S., M.N. Gillespie, and I.F.J.C. McMurtry, *Fifty years of monocrotaline-induced pulmonary hypertension: what has it meant to the field?* 2017. **152**(6): p. 1106-1108.
34. Campian, M.E., et al., *How valid are animal models to evaluate treatments for pulmonary hypertension?* 2006. **373**(6): p. 391-400.
35. Handoko, M., et al., *Opposite effects of training in rats with stable and progressive pulmonary hypertension*. 2009. **120**(1): p. 42-49.
36. Sztuka, K. and M.J.P.r. Jasińska-Stroschein, *Animal models of pulmonary arterial hypertension: a systematic review and meta-analysis of data from 6126 animals*. 2017. **125**: p. 201-214.
37. Crosswhite, P. and Z.J.M.m. Sun, *Molecular mechanisms of pulmonary arterial remodeling*. 2014. **20**(1): p. 191-201.
38. Pei, Y., et al., *Rosuvastatin attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension via regulation of Akt/eNOS signaling and asymmetric dimethylarginine metabolism*. 2011. **666**(1-3): p. 165-172.
39. Alencar, A.K., et al., *N-acylhydrazone derivative ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension through the modulation of adenosine AA2R activity*. 2014. **173**(2): p. 154-162.

40. Ahmed, L.A., et al., *Role of oxidative stress, inflammation, nitric oxide and transforming growth factor-beta in the protective effect of diosgenin in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. 2014. **740**: p. 379-387.
41. Shah, M., K. Patel, and P.B.J.A.J.o.P.-C.P. Sehgal, *Monocrotaline pyrrole-induced endothelial cell megalocytosis involves a Golgi blockade mechanism*. 2005. **288**(4): p. C850-C862.
42. Jasmin, J.-F., et al., *Effectiveness of a nonselective ETA/B and a selective ETA antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension*. 2001. **103**(2): p. 314-318.
43. Wilson, D.W., et al., *Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats*. 1989. **38**(1): p. 57-80.
44. West, J. and A.J.C.P. Hemnes, *Experimental and transgenic models of pulmonary hypertension*. 2011. **1**(2): p. 769-782.
45. Hu, Y., et al., *AOS ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension by restraining the activation of P-selectin/p38MAPK/NF- $\kappa$ B pathway in rats*. 2019. **109**: p. 1319-1326.
46. Okada, M., et al., *Effects of telmisartan on right ventricular remodeling induced by monocrotaline in rats*. 2009. **111**(2): p. 193-200.
47. Novelli, D., et al., *Monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: Time-course of injury and comparative evaluation of macitentan and Y-27632, a Rho kinase inhibitor*. 2019. **865**: p. 172777.
48. Enache, I., et al., *Downhill exercise training in monocrotaline-injected rats: Effects on echocardiographic and haemodynamic variables and survival*. 2017. **110**(2): p. 106-115.
49. Türck, P., et al., *Trapidil improves hemodynamic, echocardiographic and redox state parameters of right ventricle in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension model*. 2018. **103**: p. 182-190.
50. Stenmark, K.R., et al., *Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure*. 2009. **297**(6): p. L1013-L1032.
51. Dahal, B.K., et al., *Involvement of mast cells in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. 2011. **12**(1): p. 1-11.
52. Savai, R., et al., *Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension*. 2012. **186**(9): p. 897-908.
53. Nogueira-Ferreira, R., et al., *Exercise preconditioning prevents MCT-induced right ventricle remodeling through the regulation of TNF superfamily cytokines*. 2016. **203**: p. 858-866.
54. Colombo, R., et al., *Effects of exercise on monocrotaline-induced changes in right heart function and pulmonary artery remodeling in rats*. 2013. **91**(1): p. 38-44.
55. Suzuki, T., et al., *Mesenchymal stem/stromal cells stably transduced with an inhibitor of CC chemokine ligand 2 ameliorate bronchopulmonary dysplasia and pulmonary hypertension*. 2020. **22**(4): p. 180-192.
56. Horiguchi, M., et al., *Pulmonary administration of integrin-nanoparticles regenerates collapsed alveoli*. 2014. **187**: p. 167-174.
57. Borges, E.d.R., A.M. Ab'Saber, and C.S.V.J.J.B.d.P. Barbas, *Síndromes hemorrágicas pulmonares*. 2005. **31**: p. s36-s43.

58. D'Alonzo, G.E., et al., *Survival in patients with primary pulmonary hypertension: results from a national prospective registry*. 1991. **115**(5): p. 343-349.
59. Zolty, R.J.P. and Therapeutics, *Pulmonary arterial hypertension specific therapy: The old and the new*. 2020. **214**: p. 107576.
60. Benza, R.L., et al., *An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the REVEAL Registry*. 2012. **142**(2): p. 448-456.
61. Gielen, S., et al., *Exercise training in patients with heart disease: review of beneficial effects and clinical recommendations*. 2015. **57**(4): p. 347-355.
62. Collaborative, E., et al., *Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH)*. 2004. **328**(7433): p. 189.
63. Troosters, T., et al., *Pulmonary rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease*. 2005. **172**(1): p. 19-38.
64. Mereles, D., et al., *Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension*. 2006. **114**(14): p. 1482-1489.
65. Chan, L., et al., *Benefits of intensive treadmill exercise training on cardiorespiratory function and quality of life in patients with pulmonary hypertension*. 2013. **143**(2): p. 333-343.
66. Weinstein, A.A., et al., *Effect of aerobic exercise training on fatigue and physical activity in patients with pulmonary arterial hypertension*. 2013. **107**(5): p. 778-784.
67. Yuan, P., et al., *Exercise training for pulmonary hypertension: a systematic review and meta-analysis*. 2015. **178**: p. 142-146.
68. Arena, R., et al., *The effect of exercise training on the pulmonary arterial system in patients with pulmonary hypertension*. 2015. **57**(5): p. 480-488.
69. Handoko, M., et al., *Perspectives on novel therapeutic strategies for right heart failure in pulmonary arterial hypertension: lessons from the left heart*. 2010. **19**(115): p. 72-82.
70. Moreira-Gonçalves, D., et al., *Cardioprotective effects of early and late aerobic exercise training in experimental pulmonary arterial hypertension*. 2015. **110**(6): p. 1-15.
71. Natali, A.J., et al., *Voluntary exercise delays heart failure onset in rats with pulmonary artery hypertension*. 2015. **309**(3): p. H421-H424.
72. Soares, L.L., et al., *Voluntary running counteracts right ventricular adverse remodeling and myocyte contraction impairment in pulmonary arterial hypertension model*. 2019. **238**: p. 116974.
73. de Jesus Silva, F., et al., *Continuous Aerobic Exercise Prevents Detrimental Remodeling and Right Heart Myocyte Contraction and Calcium Cycling Dysfunction in Pulmonary Artery Hypertension*. 2021. **77**(1): p. 69-78.
74. Soares, L.L., et al., *Resistance Exercise Training Mitigates Left Ventricular Dysfunctions in Pulmonary Artery Hypertension Model*. 2022(00): p. 00-00.
75. Babu, A.S., et al., *Effects of exercise training on exercise capacity in pulmonary arterial hypertension: a systematic review of clinical trials*. 2016. **25**(4): p. 333-341.
76. Buys, R., A. Avila, and V.A.J.B.p.m. Cornelissen, *Exercise training improves physical fitness in patients with pulmonary arterial hypertension: a systematic review and meta-analysis of controlled trials*. 2015. **15**(1): p. 1-9.

77. Schmidt, C., et al., *Exercise preconditioning prevents left ventricular dysfunction and remodeling in monocrotaline-induced pulmonary hypertension*. 2020. **5**(5).
78. Woolstenhulme, J.G., et al., *Left ventricular function before and after aerobic exercise training in women with pulmonary arterial hypertension*. 2019. **39**(2): p. 118.
79. Dean, A.S., et al., *Resistance training improves vasoreactivity in end-stage heart failure patients on inotropic support*. 2011. **26**(3): p. 218-223.
80. Jankowska, E.A., et al., *The 12-week progressive quadriceps resistance training improves muscle strength, exercise capacity and quality of life in patients with stable chronic heart failure*. 2008. **130**(1): p. 36-43.
81. Silva, B.S., et al., *Inflammatory and metabolic responses to different resistance training on chronic obstructive pulmonary disease: a randomized control trial*. 2018. **9**: p. 262.
82. Portes, A.M.O., *Efeitos do treinamento resistido prévio sobre a força muscular e a morfologia e função cardiopulmonar em ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina*. 2020.
83. Moura, A.G., *Efeitos do treinamento físico resistido sobre propriedades histológicas, morfológicas, mecânicas, gênicas e proteicas do coração de ratos espontaneamente hipertensos*. 2020.
84. Perilhao, M.S., et al., *Linear periodization of strength training in blocks attenuates hypertension and diastolic dysfunction with normalization of myocardial collagen content in spontaneously hypertensive rats*. 2020. **38**(1): p. 73-81.
85. Shaw, I., B.S. Shaw, and O.J.C.j.o.A. Krasilshchikov, *Comparison of aerobic and combined aerobic and resistance training on low-density lipoprotein cholesterol concentrations in men: cardiovascular topic*. 2009. **20**(5): p. 290-295.
86. Mancia, G., et al., *2013 Practice guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and the European Society of Cardiology (ESC): ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension*. 2013. **31**(10): p. 1925-1938.
87. Sanches, I., et al., *Standardization of resistance exercise training: effects in diabetic ovariectomized rats*. 2014. **35**(04): p. 323-329.
88. Barroso, W.K.S., et al., *Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial–2020*. 2021. **116**: p. 516-658.
89. Maiorana, A., et al., *Effect of aerobic and resistance exercise training on vascular function in heart failure*. 2000. **279**(4): p. H1999-H2005.
90. González-Saiz, L., et al., *Benefits of skeletal-muscle exercise training in pulmonary arterial hypertension: The WHOLEi+ 12 trial*. 2017. **231**: p. 277-283.
91. Kabitz, H.-J., et al., *The combination of exercise and respiratory training improves respiratory muscle function in pulmonary hypertension*. 2014. **192**(2): p. 321-328.
92. Mainguy, V., et al., *Peripheral muscle dysfunction in idiopathic pulmonary arterial hypertension*. 2010. **65**(2): p. 113-117.
93. Sanches, I.C., et al., *Combined aerobic and resistance exercise training attenuates cardiac dysfunctions in a model of diabetes and menopause*. 2018. **13**(9): p. e0202731.

94. Shimojo, G.L., et al., *Combined aerobic and resistance exercise training improve hypertension associated with menopause*. 2018: p. 1471.
95. Sedaghat, M., S. Choobineh, and A.A.J.L.S. Ravasi, *Taurine with combined aerobic and resistance exercise training alleviates myocardium apoptosis in STZ-induced diabetes rats via Akt signaling pathway*. 2020. **258**: p. 118225.
96. Sale, D., et al., *Comparison of two regimens of concurrent strength and endurance training*. 1990. **22**(3): p. 348-356.
97. Trueblood, N.A., et al., *Biphasic temporal pattern in exercise capacity after myocardial infarction in the rat: relationship to left ventricular remodeling*. 2005. **288**(1): p. H244-H249.
98. Zimmer, A., et al., *Effects of aerobic exercise training on metabolism of nitric oxide and endothelin-1 in lung parenchyma of rats with pulmonary arterial hypertension*. 2017. **429**(1): p. 73-89.
99. Hornberger Jr, T.A. and R.P.J.C.j.o.a.p. Farrar, *Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat*. 2004. **29**(1): p. 16-31.
100. Sahn, D.J., et al., *Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements*. 1978. **58**(6): p. 1072-1083.
101. Júnior, M.A.C., *Efeitos do treinamento físico e do destreinamento sobre propriedades moleculares e mecânicas de cardiomiócitos isolados de ratos normotensos e hipertensos*.
102. Cagnacci, A., et al., *Effects of low doses of transdermal 17 beta-estradiol on carbohydrate metabolism in postmenopausal women*. 1992. **74**(6): p. 1396-1400.
103. Rouyer, O., et al., *Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on skeletal muscle oxidative function and exercise capacity in streptozotocin-induced diabetic rats*. 2007. **92**(6): p. 1047-1056.
104. Soares, L., et al., *Exercise training and pulmonary arterial hypertension: A review of the cardiac benefits*. 2018. **33**(4): p. 197-206.
105. Souza-Rabbo, M.P., et al., *Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats*. 2008. **35**(8): p. 944-948.
106. Garfield, B.E., et al., *Growth/differentiation factor 15 causes TGF $\beta$ -activated kinase 1-dependent muscle atrophy in pulmonary arterial hypertension*. 2019. **74**(2): p. 164-176.
107. Gomes, G.d.J., et al., *Swimming Training Does Not Affect the Recovery of Femoral Midshaft Structural and Mechanical Properties in Growing Diabetic Rats Treated with Insulin*. 2021. **11**(8): p. 786.
108. Leite, R.D., et al., *Resistance training may concomitantly benefit body composition, blood pressure and muscle MMP-2 activity on the left ventricle of high-fat fed diet rats*. 2013. **62**(10): p. 1477-1484.
109. de Lima-Seolin, B.G., et al., *Bucindolol improves right ventricle function in rats with pulmonary arterial hypertension through the reversal of autonomic imbalance*. 2017. **798**: p. 57-65.
110. Campos-Carraro, C., et al., *Copaiba oil attenuates right ventricular remodeling by decreasing myocardial apoptotic signaling in monocrotaline-induced rats*. 2018. **72**(5): p. 214-221.

111. Lee, H., et al., *Effect of ambrisentan therapy on the expression of endothelin receptor, endothelial nitric oxide synthase and NADPH oxidase 4 in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension rat model.* 2019. **49**(9): p. 866-876.
112. Wang, L., et al., *Chrysin ameliorates ANTU-induced pulmonary edema and pulmonary arterial hypertension via modulation of VEGF and eNOs.* 2019. **33**(7): p. e22332.
113. Singal, P.K., et al., *Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale.* 2004. **260**(1): p. 21-29.
114. Chin, K.M., N.H. Kim, and L.J.J.C.a.d. Rubin, *The right ventricle in pulmonary hypertension.* 2005. **16**(1): p. 13-18.
115. Ashor, A.W., et al., *Exercise modalities and endothelial function: a systematic review and dose–response meta-analysis of randomized controlled trials.* 2015. **45**(2): p. 279-296.
116. Bernardo, B.C., et al., *Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies.* 2010. **128**(1): p. 191-227.
117. Fowler, E.D., et al., *Decreased creatine kinase is linked to diastolic dysfunction in rats with right heart failure induced by pulmonary artery hypertension.* 2015. **86**: p. 1-8.
118. Rain, S., et al., *Right ventricular diastolic impairment in patients with pulmonary arterial hypertension.* 2013. **128**(18): p. 2016-2025.
119. Bers, D.M.J.N., *Cardiac excitation–contraction coupling.* 2002. **415**(6868): p. 198-205.
120. Pacagnelli, F.L., et al., *Preventive aerobic training exerts a cardioprotective effect on rats treated with monocrotaline.* 2016. **97**(3): p. 238-247.
121. Melo, S.F.S., et al., *Resistance training regulates cardiac function through modulation of miRNA-214.* 2015. **16**(4): p. 6855-6867.
122. Wang, Z., et al., *Organ-level right ventricular dysfunction with preserved Frank-Starling mechanism in a mouse model of pulmonary arterial hypertension.* 2018. **124**(5): p. 1244-1253.
123. Colombo, R., et al., *Exercise training contributes to H2O2/VEGF signaling in the lung of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension.* 2016. **87**: p. 49-59.
124. Kemi, O.J. and U.J.A.p. Wisløff, *Mechanisms of exercise-induced improvements in the contractile apparatus of the mammalian myocardium.* 2010. **199**(4): p. 425-439.
125. Shults, N.V., et al., *Ultrastructural changes of the right ventricular myocytes in pulmonary arterial hypertension.* 2019. **8**(5): p. e011227.
126. Li, Y., et al., *Osthole attenuates right ventricular remodeling via decreased myocardial apoptosis and inflammation in monocrotaline-induced rats.* 2018. **818**: p. 525-533.
127. Liu, Z., et al., *Effect of estrogen on right ventricular remodeling of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats and its mechanism.* 2019. **23**(4): p. 1742-50.
128. Shi, R., et al., *Baicalein attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by inhibiting vascular remodeling in rats.* 2018. **48**: p. 124-135.

129. Nogueira-Ferreira, R., et al., *Mechanisms underlying the impact of exercise training in pulmonary arterial hypertension*. 2018. **134**: p. 70-78.
130. Harbaum, L., et al., *Acute effects of exercise on the inflammatory state in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension*. 2016. **16**(1): p. 1-11.
131. Taylor, S., et al., *The role of neutrophils and neutrophil elastase in pulmonary arterial hypertension*. 2018. **5**: p. 217.
132. Tuder, R.M.J.C. and t. research, *Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension*. 2017. **367**(3): p. 643-649.
133. Humbert, M., et al., *Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension*. 2004. **43**(12S): p. S13-S24.
134. Humbert, M., O. Sitbon, and G.J.N.E.J.o.M. Simonneau, *Treatment of pulmonary arterial hypertension*. 2004. **351**(14): p. 1425-1436.
135. Wu, F., et al., *Protective effects of aloperine on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. 2017. **89**: p. 632-641.
136. Dianat, M., et al., *Contribution of reactive oxygen species via the OXR1 signaling pathway in the pathogenesis of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: The protective role of Crocin*. 2020. **256**: p. 117848.

## 9.ANEXO – CERTIFICADO APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 02/2021, intitulado “**Efeitos do treinamento físico combinado sobre a morfologia e a função cardiopulmonar e muscular esquelética em ratos com 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 16/02/2021, com validade de 12 meses.

### CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 02/2021, named “**Effects of combined physical training on morphology and cardiopulmonary and skeletal muscle function in rats with 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 and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on February 16, 2021 valid for 12 months.



Prof.ª Mariella Bontempo Duca de Freitas  
Coordenadora

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV