

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**ALEXANDRE MARTINS OLIVEIRA PORTES**

**EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO PRÉVIO SOBRE A FORÇA  
MUSCULAR E A MORFOLOGIA E FUNÇÃO CARDIOPULMONAR EM  
RATOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR  
MONOCROTALINA**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2020**

**ALEXANDRE MARTINS OLIVEIRA PORTES**

**EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO PRÉVIO SOBRE A FORÇA MUSCULAR E A MORFOLOGIA E FUNÇÃO CARDIOPULMONAR EM RATOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA**

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

Orientador: Antônio José Natali

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2020**

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

T

P849e  
2020

Portes, Alexandre Martins Oliveira, 1996-  
Efeitos do treinamento resistido prévio sobre a força muscular e a morfologia e função cardiopulmonar em ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina / Alexandre Martins Oliveira Portes. – Viçosa, MG, 2020.  
88 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.  
Orientador: Antônio José Natali.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 76-87.

1. Treinamento de resistência. 2. Hipertensão pulmonar.  
3. Monocrotalina. 4. Miócitos cardíacos. 5. Contração muscular.  
6. Excursão sistólica do plano anular tricúspide. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Educação Física. Programa de Pós-Graduação em Educação Física. II. Título.

CDD 22. ed. 631.713

ALEXANDRE MARTINS OLIVEIRA PORTES

**EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO PRÉVIO SOBRE A FORÇA MUSCULAR E A MORFOLOGIA E FUNÇÃO CARDIOPULMONAR EM RATOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA**

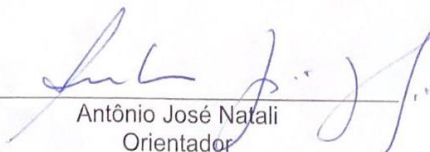
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Educação Física, para obtenção do título *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de dezembro de 2020.

Assentimento:



Alexandre Martins Oliveira Portes  
Autor



Antônio José Natali  
Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelas conquistas e por me dar forças para alcançar meus objetivos;  
Aos meus pais Elaine e José Jaime, por todo amor e por sempre estarem ao meu lado, apoiando-me por toda minha vida;

À minha avó Maria Auxiliadora, por todo amor, carinho e por toda dedicação que sempre teve por mim;

À minha namorada Larissa Saraiva, pelo companheirismo incondicional, por todo amor e por sempre estar ao meu lado;

Ao meu orientador, professor Antônio José Natali, por todos os seus ensinamentos e as suas contribuições para a minha formação profissional, e por toda ajuda, presença constante e paciência para a construção deste trabalho;

À Meilene Fidelis, por toda contribuição e auxílio durante a realização dos experimentos;

Ao professor Anselmo Gomes de Moura, por todos ensinamentos e auxílios desde a graduação;

Aos meus amigos do BioEx Leôncio Soares, Leonardo Rezende, Luciano Bernardes, Maíra Oliveira, Bruna Fonseca, Daniel de Oliveira, Eberton Lopes e Franciany Silva, pelo auxílio constante durante os experimentos e pelos momentos de diversão;

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

À minha coorientadora, professora Emily Correna Carlo Reis, pelo auxílio e pela disponibilidade para realização das análises ecocardiográficas;

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realizar a pós-graduação;

À Banca, por aceitarem o convite e pela participação;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

PORTES, Alexandre Martins Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2020. **Efeitos do treinamento resistido prévio sobre a força muscular e a morfologia e função cardiopulmonar em ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina.** Orientador: Antônio José Natali.

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do treinamento resistido (TR) prévio sobre a força muscular, a morfologia e a função cardiopulmonar em ratos com hipertensão arterial pulmonar (HAP) severa induzida por monocrotalina (MCT). Para tal, ratos Wistar (idade ~ 6 semanas) foram divididos em quatro grupos de 13 animais, a saber: sedentário controle (SC); sedentário monocrotalina (SM); treinado monocrotalina sem continuidade do treinamento (TMSC); e treinado monocrotalina com continuidade do treinamento (TMCC). O TR foi realizado por um período de 8 semanas, 3x/semana. Em seguida, os animais dos grupos SM, TMSC e TMCC receberam uma injeção intraperitoneal de MCT (60 mg/kg), enquanto os do grupo SC receberam o mesmo volume de salina. O grupo TMCC continuou o TR por mais 6 semanas e o grupo TMSC permaneceu em suas caixas pelo mesmo período, até a data de eutanásia. Os animais dos grupos SC e SM permanecerem em suas caixas durante todo período experimental. As sessões de TR consistiram de 4 a 9 escaladas em escada vertical carregando cargas progressivas [4 escaladas com 50%, 75%, 90% e 100% do peso máximo carregado (PMC); mais 30g a cada escalada subsequente]. O PMC foi avaliado nas semanas 1, 4 e 8, antes da aplicação de MCT ou salina, e nos dias 20, 27, 34 e 41, após a aplicação de MCT ou salina. A avaliação ecocardiográfica foi realizada ao final da 8ª semana, antes da aplicação de MCT, e nos dias 24 e 42, após a aplicação de MCT ou salina, para avaliação da razão tempo de aceleração e tempo de ejeção (TA/TE) e da *tricuspid annular systolic plane excursion* (TAPSE). Análises histomorfométricas foram realizadas nos tecidos do ventrículo direito (VD), pulmão e bíceps braquial. Em miócitos isolados do VD, foram analisados contração e cálcio ( $Ca^{2+}$ ) intracelular transiente. Os dados foram comparados, conforme distribuição normal ou não normal, usando-se análise de variância ou Kruskal-Wallis, respectivamente, seguidos de teste *post hoc* apropriado, sendo erro alfa adotado de 5%. Os resultados mostraram que o TR aumentou o PMC relativo, nas semanas 4 e 8, em comparação à semana 1 e ao grupo SM, antes da injeção de MCT. Após a aplicação de MCT, o PMC relativo permaneceu maior nos

grupos treinados que nos sedentários ( $P < 0,05$ ). O PMC relativo do grupo TMSC não foi diferente daquele do grupo SM nos dias 27 e 34 após injeção de MCT ( $P > 0,05$ ). O TR preveniu o aumento da resistência da artéria pulmonar (redução da TA/TE) e a redução da função do VD (redução da TAPSE), 24 dias após injeção de MCT, apenas no grupo TMCC. O mesmo foi observado nos dois grupos treinados no dia 42 após injeção de MCT. O TR preveniu o aumento das massas do coração e do VD e a redução da massa do bíceps braquial. O TR preveniu o aumento da área de secção transversa dos miócitos do VD. O TR também preveniu, mas apenas no grupo TMCC, o aumento da largura e a razão comprimento/largura celular. No pulmão direito, o TR preveniu a redução do percentual de alvéolos pulmonares e o aumento do percentual de alvéolos hemorrágicos, apenas no grupo TMCC. No bíceps braquial, o TR preveniu a redução da área de secção transversa e aumentou o percentual de núcleos. Em miócitos isolados do VD, o TR preveniu a redução da amplitude e da velocidade de contração (3 e 5 Hz), o aumento dos tempos para o pico de contração (1, 3, 5 e 7 Hz) e 50% de relaxamento (1, 3 e 5 Hz), somente no grupo TMCC. O TR preveniu o aumento da amplitude do  $Ca^{2+}$  intracelular transiente (1, 3 e 5 Hz) e dos tempos para o pico (1, 3, 5 e 7 Hz) e para 50% do decaimento do  $Ca^{2+}$  intracelular transiente (5 Hz), apenas no grupo TMCC. O TR preveniu a redução da responsividade das células à estimulação a 7 Hz, apenas no grupo TMCC. Em conclusão, o TR aplicado aumenta a força muscular e previne a redução da função sistólica e a hipertrofia do VD, além de prevenir o aumento da resistência da artéria pulmonar e a atrofia muscular esquelética em ratos com HAP severa induzida por MCT. Todavia, os efeitos preventivos sobre o remodelamento pulmonar adverso, o aumento das dimensões celulares e as disfunções da contratilidade e do  $Ca^{2+}$  intracelular transiente de miócitos isolados do VD são evidentes apenas quando o TR prévio é continuado após a indução da HAP por MCT (grupo TMCC), o que indica a presença de destreinamento quando o TR é descontinuado (grupo TMSC).

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

## ABSTRACT

PORTES, Alexandre Martins Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2020. **Effects of prior resistance training on muscle strength and cardiopulmonary morphology and function in rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension.** Adviser: Antônio José Natali.

This study aimed to investigate the effects of previous resistance training (RT) on muscle strength, cardiopulmonary morphology and function in rats with severe monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension (PAH) (MCT). Wistar rats (age ~ 6 weeks) were divided into four groups of 13 animals: sedentary control (SC); sedentary monocrotaline (SM); monocrotaline trained without training continuity (TMSC); and trained monocrotaline with continuity of training (TMCC). The RT was performed for 8 weeks, 3 days/week. Then, animals in the SM, TMSC and TMCC groups received an intraperitoneal injection of MCT (60 mg / kg), while those in the SC group received the same volume of saline. The TMCC group continued the TR for 6 weeks and the TMSC group remained in their cages for the same period, until euthanasia. The animals in the SC and SM groups remained in their cages throughout the experimental period. The TR consisted of 4 to 9 vertical ladder climbs carrying progressive loads [4 climbs with 50%, 75%, 90% and 100% of the maximum carrying load (MCL); plus 30g in each subsequent climb]. The MCL was evaluated at weeks 1, 4 and 8, before MCT or saline injection, and on days 20, 27, 34 and 41, after MCT or saline injection. The echocardiographic evaluation was performed at the end of the 8<sup>th</sup> week before MCT or saline injection, and on days 24 and 42, after MCT or saline injection, to evaluate the ratio of acceleration time and ejection time (TA/TE) and tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE). Histomorphometric analyzes were performed on right ventricle (RV), lung and brachial biceps tissues. Contraction and intracellular calcium (Ca<sup>2+</sup>) transient were analyzed. Data were compared, according to normal or non-normal distribution, using analysis of variance or Kruskal-Wallis, respectively, followed by an appropriate post hoc test. P < 0.05 was considered significant. The results showed that TR increased the relative MCL, at weeks 4 and 8, compared to week 1 and to SM group, before MCT injection. After the MCT injection, the relative MCL remained higher in the trained groups than in the sedentary ones (P<0.05). The relative MCL of the TMSC group was not different from that of the SM group on days 27 and 34 after injection of MCT (P>0.05). RT prevented the increase

in pulmonary artery resistance (reduction of TA/TE) and reduction of RV systolic function (reduction of TAPSE), 24 days after MCT injection, only in the TMCC group. The same was observed in both trained groups, on day 42 after MCT injection. TR prevented increases in heart and RV mass and reduction in the brachial biceps mass. The TR prevented the increase in the RV myocyte cross-sectional area. The TR also prevented, but only in the TMCC group, increases in cell width and length/width ratio. In the right lung, the TR prevented reductions in the percentage of pulmonary alveoli and increases in the percentage of hemorrhagic alveoli, only in the TMCC group. In the brachial biceps, the TR prevented reductions in the cross-sectional area and increases in the percentage of nuclei. In RV myocytes, the TR prevented reductions in contraction amplitude and velocity (3 and 5 Hz), increases in the times to peak of contraction (1, 3, 5 and 7 Hz) and to 50% relaxation (1, 3 and 5 Hz), only in the TMCC group. The RT prevented increases in the amplitude of the intracellular  $Ca^{2+}$  transient (1, 3 and 5 Hz) and in the times to peak (1, 3, 5 and 7 Hz) and to 50% decay (5 Hz), only in the TMCC group. The TR prevented the reduction in the number of cells responding to stimulation at 7 Hz, only in the TMCC group. In conclusion, the employed RT increases muscle strength and prevents reductions in RV systolic function and hypertrophy, increases in pulmonary artery resistance and skeletal muscle atrophy in rats with severe MCT-induced PAH. However, the preventive effects on adverse pulmonary remodeling, increases in RV myocyte dimensions and contraction and intracellular  $Ca^{2+}$  transient dysfunctions are evident only when the previous RT is continued after MCT-induced PAH (TMCC group), which indicates the presence of detraining when the TR is discontinued (TMSC group).

**Keywords:** Resistance training. Pulmonary hypertension. MCT. Isolated myocytes. Contraction. TAPSE.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cronologia dos experimentos.....	30
<b>Figura 2.</b> Imagem representativa do treinamento resistido.....	31
<b>Figura 3.</b> Imagens representativas do ecodoppler cardiograma .....	33
<b>Figura 4.</b> Representação das dimensões medidas em imagem de cardiomiócito ventricular de rato.....	39
<b>Figura 5.</b> Traçado representativo da contração celular (1 Hz) e dos respectivos parâmetros da contração analisados .....	41
<b>Figura 6.</b> Traçado representativo do cálcio intracelular transiente (1 Hz) e os respectivos parâmetros analisados .....	42
<b>Figura 7.</b> Força muscular.....	44
<b>Figura 8.</b> Resistência da artéria pulmonar.....	45
<b>Figura 9.</b> Função sistólica do ventrículo direito.....	46
<b>Figura 10.</b> Área de secção transversa de miócitos do ventrículo direito.....	49
<b>Figura 11.</b> Histomorfometria do ventrículo direito.....	51
<b>Figura 12.</b> Dimensões de miócitos isolados do ventrículo direito.....	54
<b>Figura 13.</b> Fotomicrografia representativa do pulmão.....	55
<b>Figura 14.</b> Histomorfometria do bíceps braquial.....	59
<b>Figura 15.</b> Contratilidade de miócitos isolados do ventrículo direito.....	62
<b>Figura 16.</b> Cálcio intracelular transiente de miócitos isolados do ventrículo direito..	64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Massa corporal, índice de massa corporal, massa dos órgãos e razões..	48
<b>Tabela 2.</b> Proporções histomorfométricas entre os elementos teciduais do ventrículo direito..	53
<b>Tabela 3.</b> Proporções histomorfométricas entre os elementos teciduais do pulmão.	57
<b>Tabela 4.</b> Proporções histomorfométricas entre os elementos teciduais do bíceps braquial.	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$ -MHC: miosina de cadeia pesada alfa  
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  
 $\beta$ -MHC: miosina de cadeia pesada beta  
 $\text{Ca}^{2+}$ : íon cálcio  
 $\text{CaCl}_2$ : cloreto de cálcio  
CEUA-UFV: Comissão de Ética no Uso de Animais  
 $\text{CO}_2$ : dióxido de carbono  
COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal  
COL1-A1: colágeno alfa-1 tipo 1  
COL3-A1: colágeno alfa-3 tipo 1  
DMSO: dimetilsulfóxido de dimetilo  
EGTA: ácido tetracético etilenoglicol  
eNOS (óxido nítrico sintase endotelial)  
EPM: erro padrão da média  
ET-1: endotelina 1  
FURA-2AM: Éster Fura-2-acetoximetílico  
HAP: hipertensão arterial pulmonar  
H & E: hematoxilina e eosina  
HEPES: ácido etanosulfônico – hidroxietil piperazina  
HIV: vírus da imunodeficiência humana  
HP: hipertensão pulmonar  
IL-10: interlucina 10  
IL-1 $\beta$ : interleucina 10 beta  
KCl: cloreto de potássio  
MCT: monocrotalina  
MCTP: metabólico pirrol da monocrotalina  
 $\text{MgCl}_2$ : cloreto de magnésio

miRNA: microRNA  
MMP: metaloproteinases de matriz  
MMP-2: metaloproteinases de matriz do tipo 2  
MMP-9: metaloproteinases de matriz do tipo 9  
mTOR: alvo da rapamicina em mamíferos  
Na<sup>+</sup>: íon sódio  
NaCl: cloreto de sódio  
NCX: trocador de Na<sup>+</sup>/ Ca<sup>2+</sup>  
O<sub>2</sub>: oxigênio  
ON: óxido nítrico  
PAD: pressão arterial diastólica  
PAPm: pressão arterial pulmonar média  
PGI<sub>2</sub>: prostaciclina  
PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase  
PLB: fosfolambam  
PLBser16: fosfolambam fosforilada na serina 16  
RNAm: RNA mensageiro  
RS: retículo sarcoplasmático  
RVP: resistência vascular pulmonar  
RVSP: pressão sistólica do ventrículo direito  
RyR2: canais receptores de rianodina do tipo 2  
SC: sedentário controle  
SERCA2a: isoforma cardíaca da Ca<sup>2+</sup> ATPase do retículo sarcoplasmático  
SHR: rato espontaneamente hipertenso  
SM: sedentário monocrotalina  
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  
TGF-beta: fator de crescimento transformador beta  
TMCC: treinado monocrotalina com continuidade  
TMSC: treinado monocrotalina sem continuidade  
TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa

TR: treinamento resistido

TXA2: tromboxano A2

TXB2: tromboxano B2

UFV: Universidade Federal de Viçosa

VD: ventrículo direito

VDF: volume diastólico final

VE: ventrículo esquerdo

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

VSF: volume sistólico final

WU: unidades wood

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1. Hipertensão arterial pulmonar .....	16
1.2. Modelo de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina .....	17
1.3. Tratamento da hipertensão arterial pulmonar .....	24
1.3.1. Exercício físico.....	25
1.3.2. Exercício físico prévio .....	26
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
2.1. Geral .....	28
2.2. Específicos.....	28
<b>3. HIPÓTESES.....</b>	<b>28</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
4.1. Animais e desenho experimental .....	29
4.2. Protocolo de treinamento resistido .....	30
4.2.1. Familiarização à escada .....	30
4.2.2. Teste de carga máxima carregada .....	31
4.2.3. Protocolo de treinamento resistido .....	32
4.3. Ecodopplercardiograma .....	32
4.4. Avaliação antropométrica.....	34
4.5. Indução da hipertensão arterial pulmonar .....	34
4.6. Coleta e processamento de amostras.....	34
4.6.1. Eutanásia.....	34
4.6.2. Processamento para histomorfometria.....	35
4.6.3. Isolamento de cardiomiócitos .....	35
4.6.3.1. Composição das soluções para isolamento e análises de cardiomiócitos.....	36
4.6.3.2. Solução de perfusão Tyrode.....	37

4.6.3.3. Incubação dos cardiomiócitos com indicador de fluorescência .....	37
4.7. Histomorfometria do ventrículo direito .....	38
4.8. Mensuração de comprimento e largura celular .....	38
4.9. Histomorfometria do pulmão direito .....	39
4.10. Histomorfometria do bíceps braquial .....	39
4.11. Mensuração da contratilidade celular .....	40
4.12. Mensuração do cálcio intracelular transiente .....	41
4.13. Análise estatística .....	42
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
5.1. Força muscular .....	44
5.2. Resistência da artéria pulmonar .....	45
5.3. Função sistólica do ventrículo direito .....	46
5.4. Morfometria do ventrículo e do pulmão direitos e do bíceps braquial .....	47
5.4.1. Massa corporal, índice de massa corporal, massa dos tecidos e suas razões .....	47
5.4.2. Histomorfometria do ventrículo direito .....	49
5.4.3. Dimensões de miócitos isolados do ventrículo direito .....	54
5.5.4. Histomorfometria do pulmão direito .....	55
5.5.5. Histomorfometria do músculo bíceps braquial .....	58
5.5. Função contrátil de miócitos isolados do ventrículo direito .....	61
5.6. Cálcio intracelular transiente de miócitos isolados do ventrículo direito .....	63
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
6.1. Força muscular .....	65
6.2. Resistência da artéria pulmonar .....	66
6.3. Função sistólica do ventrículo direito .....	67
6.4. Morfometria do ventrículo e do pulmão direitos e do bíceps braquial .....	68
6.4.1. Ventrículo direito .....	68
6.4.2. Pulmão direito .....	69

6.4.3. Bíceps braquial .....	70
6.5. Função contrátil e cálcio intracelular transiente de miócitos isolados do ventrículo direito.....	72
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>
<b>9. ANEXO 1 – Parecer de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais .....</b>	<b>88</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A pressão pulmonar é um parâmetro fisiológico crucial no controle do fluxo sanguíneo nos vasos pulmonares. Valores da pressão arterial pulmonar média (PAPm) de  $14,0 \pm 3,3$  mmHg são considerados “normais” em indivíduos saudáveis em repouso [1].

A hipertensão pulmonar (HP), caracterizada por valores de PAPm  $> 20$  mmHg [2], é uma doença crônica progressiva que compromete a vasculatura pulmonar e está associada ao aumento da mortalidade por todas as causas [3-5]. A HP é subdividida em 5 grupos, designados 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 [6].

No presente estudo, investigou-se, especificamente, efeitos da intervenção com exercício físico resistido prévio no desenvolvimento da HAP, em modelo animal de HAP, induzida por monocrotalina. Estimativas apontam prevalência da HAP em torno de 15 a 50 casos por milhão de indivíduos, o que a torna uma doença rara, mas considerada o tipo mais comum de HP [7].

### 1.1. Hipertensão arterial pulmonar

A HAP se caracteriza como hipertensão pulmonar pré-capilar e está associada a alterações hemodinâmicas, tais como valores da PAPm  $> 20$  mmHg, da pressão capilar pulmonar  $\leq 15$  mmHg e da resistência vascular pulmonar (RVP)  $\geq 3$  unidades Wood (WU), em repouso [2].

Destaca-se também que a HAP tem etiologia multifatorial, em maior parte idiopáticos. Com base em sua etiologia clínica, ela é subdividida em: idiopática; hereditária; induzida por drogas ou toxinas; associada a outras doenças (ex. Doença do tecido conjuntivo, HIV, hipertensão portal, doenças cardíacas congênitas e esquistossomose); associada ao uso prolongado de bloqueadores de canais de cálcio; envolvimento venoso/capilar; e persistente da síndrome do recém-nascido [2].

Sabe-se que os pacientes com HAP comumente apresentam remodelamento adverso da vasculatura pulmonar e do coração, com magnitude distinta, regida pelo estágio progressivo da doença em que o paciente se encontra. Inicialmente, os

mecanismos compensatórios são apresentados com o intuito de preservar a função cardíaca. Entretanto, com a manutenção da sobrecarga pressórica crônica, esses mecanismos passam a ser insuficientes, e o coração, mais especificamente o ventrículo direito (VD), é acometido pelo remodelamento adverso [8]. Nesse estágio, as adaptações deletérias são traduzidas em redução da complacência, da perfusão e da fração de ejeção, progredindo para dilatação da câmara, falha cardíaca e, por fim, morte [8, 9].

Com a progressão da doença, os pacientes passam a apresentar sintomas como dispneia, letargia e desconforto torácico, inicialmente observados durante o exercício físico. Posteriormente, tais sintomas são observados em estado de repouso, o que afeta diretamente a qualidade de vida. Além disso, alterações em outros órgãos e tecidos contribuem para o surgimento dos sintomas, os quais refletem na redução da capacidade de exercício físico. Notam-se, por conseguinte, alterações nos pulmões e na musculatura esquelética, tanto a que auxilia a mecânica ventilatória quanto a envolvida na execução do exercício físico [10, 11]. Nesse sentido, Malenfant et al. [12] demonstraram que pacientes com HAP apresentam menor força muscular do quadríceps quando comparados a indivíduos sem HAP. As alterações prejudiciais da musculatura esquelética, possivelmente, ocorrem em resposta ao prejuízo do suprimento de oxigênio, resultando em diminuição do número de capilares e das fibras do tipo IIA, atreladas à atrofia e à redução da força de contração [10, 13]. Nos pulmões, observa-se redução do leito vascular ligado à presença de hipóxia, em conjunto com a destruição alveolar, que, por sua vez, contribui com o surgimento de doenças do sistema respiratório, como a doença pulmonar obstrutiva crônica [14].

Os modelos animais de HAP têm sido utilizados em pesquisas especialmente para investigar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na fisiopatologia da doença, assim como as respostas a diferentes intervenções [15]. Dentre os modelos disponíveis, encontra-se a HAP induzida por meio da monocrotalina (MCT) – um alcaloide derivado da planta *crotalaria spectabilis*.

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

O primeiro estudo envolvendo esse modelo foi realizado em 1967 [16], no qual se observou, em ratas da linhagem Wistar, aumento do espessamento da vasculatura

pulmonar e da hemodinâmica e hipertrofia do ventrículo direito, após administração oral das sementes da planta. Com o passar dos anos, o modelo de indução da HAP passou a ser realizado por meio da injeção da MCT, em maior parte, na região intraperitoneal ou subcutânea. Embora os mecanismos de ação não estejam totalmente esclarecidos, sabe-se que a MCT é convertida no metabólito reativo do pirrole dehidromonocrotalina (MCTP) no fígado, através da ativação dependente do citocromo P-450, que, por sua vez, gera danos nos tecidos adjacentes, a exemplo da vasculatura pulmonar [17-20].

Nessa perspectiva, compreende-se que a gravidade dos efeitos deletérios sobre os sistemas é dependente da dosagem de MCT utilizada. Com base nisso, a dosagem de 60 mg/kg de MCT induz à HAP severa com índices elevados de toxicidade, presença de hipertrofia cardíaca patológica e lesão pulmonar aguda [17], com progressão para falha cardíaca [21]. Uma dosagem inferior (40 mg/kg) induz à HAP estável, caracterizada pela preservação do débito cardíaco [21]. Atualmente, na literatura, a maioria dos estudos foram realizados com a dosagem de 60 mg/kg de MCT para indução da HAP [15].

Neste modelo, ocorre um desequilíbrio entre fatores vasodilatadores e vasoconstritores na vasculatura pulmonar. Sabe-se que ratos tratados com MCT apresentam redução da expressão da proteína quinase B (Akt) e do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) [22, 23] e da Akt eNOS fosforilada [24] na vasculatura pulmonar, resultando em prejuízos na vasodilatação arterial. No estudo de Ahmed et al. [25], a aplicação de 60 mg/kg de MCT, além de reduzir a expressão da eNOS, também reduziu os níveis séricos de óxido nítrico (ON), o que, por sua vez, contribuiu com o remodelamento adverso da vasculatura pulmonar.

Nesse sentido, evidências indicam elevação dos níveis plasmáticos de endotelina 1 (ET-1) em ratos após administração com MCT [26, 27]. A ET-1 é um potente vasoconstritor e a sua biodisponibilidade é o produto final da sinalização via MEK1-2/MAPK, a qual pode estar em hiperatividade na HAP, contribuindo, assim, com o remodelamento arterial [28]. Somente um estudo [29] avaliou os efeitos da MCT sobre a ativação da MEK1/2 e, nesse, a doença promoveu aumento.

Somado a isso, outros vasoconstritores podem exercer papéis importantes sobre os efeitos deletérios na vasculatura, uma vez que a inibição do tromboxano A2 (TXA2) atrasou o desenvolvimento da HAP, associando-se à redução da espessura

da camada média da artéria pulmonar e da excreção urinária de tromboxano B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>), que, por seu turno, indica inibição da agregação plaquetária [30].

Eventualmente, o aumento de componentes vasodilatadores reduz concomitantemente os vasoconstritores. Liu et al. [31] utilizaram o antagonista do receptor acoplado à proteína G (KMUP-1) para aumentar a expressão da eNOS e, como consequência, houve redução da expressão e dos níveis plasmáticos de ET-1. Em cães, demonstrou-se que a indução de uma baixa dose de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (vasodilatador) foi capaz de reduzir o acúmulo plaquetário, a PAPm e a RVP [32]. A utilização do agonista de PGI<sub>2</sub> reduziu os efeitos deletérios da HAP sobre a vasculatura pulmonar e sobre o VD, além de aumentar o tempo de sobrevivência dos animais, ressaltando a importância entre o equilíbrio do TXA<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> para manutenção da saúde e do tônus vascular [33]. De fato, o desequilíbrio entre os fatores vasodilatadores e vasoconstritores estão intimamente associados aos prejuízos sobre a estrutura e a função da vasculatura pulmonar.

É pertinente pontuar que a vasoconstrição elevada e sustentada pode aumentar o estresse por sobrecarga pressórica nas camadas das artérias (túnica íntima, média e adventícia) e, em resposta ao estresse contínuo e exacerbado, essas podem sofrer alterações de acordo com a magnitude e duração da sobrecarga submetida [34, 35]. No que concerne à túnica íntima, essa é a camada mais interna e mais fina, e, por esse motivo, está mais suscetível a lesões por estresse hemodinâmico e à degradação das células endoteliais. Em resposta ao reparo das lesões, ocorre a substituição do tecido endotelial por tecido fibrótico não-endotelial e a migração de células inflamatórias [36, 37]. As células inflamatórias, por exemplo, os macrófagos, podem dar origem a citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), o qual está intimamente ligado à promoção de apoptose tecidual [38].

Nessa perspectiva, a aplicação de MCT promove aumento substancial da espessura da parede das arteríolas pulmonares [39-42], acompanhado do aumento da área de colágeno vascular [43]. No estudo de Zhang et al. [44] foi demonstrado maior expressão de colágeno tipo I na vasculatura pulmonar em ratos tratados com MCT. Além disso, houve efeitos significativos do estresse hemodinâmico/mecânico exacerbado sobre o remodelamento estrutural arterial.

Outro fator do remodelamento arterial é a alteração da expressão de

metaloproteínas de matriz (MMP), em vista que a sua principal função consiste em promover degradação dos componentes da matriz extracelular, como o colágeno [45]. O estudo de Zhu et al. [46] evidenciou aumento da expressão das MMP do tipo 2 (MMP-2) e tipo 9 (MMP-9) em arteríolas de ratos tratados com MCT (60 mg/kg), associado à maior degradação de colágeno e da regulação positiva da proliferação de células musculares lisas [47, 48]. Essas alterações aumentam a rigidez arterial, o que está associado à redução da capacidade de relaxamento arterial [23]. Ademais, além da perda da capacidade de relaxamento, também há redução da área do lúmen arterial [49, 50].

A redução do lúmen e a menor capacidade de relaxamento arterial promovem sobrecarga pressórica no VD, atrelada a alterações hemodinâmicas desse [9], para a manutenção da funcionalidade. Dentre as modificações, está o aumento da pressão sistólica do ventrículo direito (RVSP) em consequência do remodelamento adverso da vasculatura pulmonar [40, 51, 52], fato que contribui para o aumento da PAPm [53, 54]. Como um ciclo, o aumento desses parâmetros hemodinâmicos aumenta o estresse por sobrecarga pressórica na vasculatura pulmonar, assim como o remodelamento vascular promove aumento dos parâmetros hemodinâmicos. Consequentemente, o VD é submetido constantemente a uma sobrecarga pressórica.

A MCT (60 mg/kg) promove a redução da razão entre o tempo de aceleração (TA) e o tempo de ejeção (TE) (TA/TE) nos animais, indicando a elevação da pós-carga [55, 56] e o aumento da resistência da artéria pulmonar. O aumento dessa pós-carga está relacionado ao remodelamento adverso da vasculatura pulmonar, em conjunto com o aumento de componentes vasoconstritores – característico desse modelo experimental.

Em exame ecocardiográfico, observa-se maior espessura da parede e do diâmetro diastólico final do VD em animais tratados com MCT, quando comparados a animais do grupo controle [25, 40, 57, 58]. Resultados similares são encontrados em relação à espessura da parede anterior do VD [25, 59, 60]. Essas alterações também podem ocorrer no final da sístole [58], entretanto, há resultados controversos [55, 61]. Nesse sentido, Lima-Seolin et al. [62] demonstraram normalização do diâmetro do VD, na sístole e na diástole, associado com a diminuição da sobrecarga pressórica (redução da RVSP) e com a redução da pós-carga.

O estudo de Fontoura et al [63] demonstrou que animais tratados com MCT (60

mg/kg) apresentam maior volume diastólico final (VDF) em comparação aos controles não tratados. Esses animais apresentavam cardiomiopatia dilatada do VD, que estaria relacionada ao aumento do diâmetro interno da câmara, e redução da espessura da parede ventricular, pela apoptose dos cardiomiócitos, característica dessa fase [63, 64]. Todavia, a cardiomiopatia dilatada não deve ser associada a uma adaptação compensatória com efeitos positivos, pois o VDF superior apresentado por esses animais não resultou em maior fração de ejeção do VD, pelo contrário, esses animais apresentaram valores inferiores em comparação aos animais do grupo controle [63].

Nesse sentido, embora os animais tratados com MCT apresentem maior VDF na fase descompensatória, os prejuízos na contratilidade celular, no encurtamento ventricular e na redução do lúmen e do relaxamento arterial contribuem para a permanência do sangue no VD após a sístole, promovendo, assim, aumento no volume sistólico final (VSF) [65], o que é acompanhado pela redução concomitante do volume sistólico e do débito cardíaco.

Efeitos adversos da MCT sobre a função do VD, como a redução do volume sistólico e do débito cardíaco, são bem conhecidos, com conseqüente prejuízo na irrigação pulmonar e sistêmica [40, 57, 62, 66]. O estudo de Daicho et al. [67] demonstrou redução do débito cardíaco e do duplo produto (índice de consumo de O<sub>2</sub> do miocárdio) somente entre 6 e 8 semanas após a aplicação de MCT. Isso indica que esse efeito deletério é observado próximo à falha cardíaca.

A TAPSE (*Tricuspid Anular Plane Systolic Excursion*) denota a função sistólica do VD. Os animais tratados com MCT apresentam valores inferiores da TAPSE [40, 57, 58] se comparados aos de animais controles não tratados. A redução da TAPSE, geralmente, está associada ao aumento da RVP, que resulta em adaptações adversas do VD de forma progressiva a partir da aplicação de MCT. No estudo de Novelli et al. [40] foram demonstrados valores regressivos que iniciaram a partir da 3ª semana após a aplicação de MCT, com redução acentuada na 5ª semana. No mesmo estudo [40], a redução da TAPSE foi acompanhada do aumento da RVSP e da espessura da parede do VD, na diástole, e da redução do TA e do débito cardíaco. Esse fato indica que prejuízos na TAPSE estão diretamente ligados a adaptações adversas do VD e da vasculatura pulmonar, envolvendo tanto a hemodinâmica quanto a estrutura.

Nesse modelo, há alterações histomorfométricas do VD, pois a MCT promove aumento da massa do coração e do VD, conhecido como hipertrofia concêntrica

patológica, que ocorre devido à constante sobrecarga pressórica. Em resposta ao aumento da pós-carga, o VD adapta-se à nova demanda, aumentando a espessura da parede, o que, por sua vez, ocorre em consequência do aumento do tamanho dos miócitos e da matriz extracelular [64].

Nesse sentido, estudos prévios demonstraram aumento da área de secção transversa (AST) dos miócitos do VD após administração de MCT [27, 68, 69]. Esse aumento da área dos miócitos é caracterizado pela adição de sarcômeros em paralelo, porém com alterações gênicas prejudiciais, como o aumento da miosina de cadeia pesada beta ( $\beta$ -MHC) [26, 60]. Além disso, por volta de 30 dias após a aplicação de MCT (60 mg/kg), os animais apresentam redução da expressão do RNA mensageiro (RNAm) do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no VD [70]. Isso indica que o aumento tecidual é superior à capacidade do sistema vascular de promover irrigação e nutrição, com consequente apoptose e necrose tecidual. No modelo de HAP severa, também se observa redução da porcentagem dos cardiomiócitos, o que pode estar associado ao aumento do estresse oxidativo e da produção de citocinas pró-inflamatórias/apoptóticas, como o TNF- $\alpha$  [68].

Ademais, a aplicação de MCT aumenta componentes da matriz extracelular, como o colágeno e promove fibrose no VD [42, 56]. Esses resultados podem ser atribuídos ao aumento da expressão proteica e do RNAm de colágenos tipo I e III [42, 53], o que torna o VD mais rígido, com prejuízos na sua capacidade lusotrópica.

Os miócitos do VD dos animais tratados com MCT apresentam prejuízos no processo de contração e relaxamento celulares. A redução da amplitude de contração celular está associada a alterações das isoformas sarcoméricas (ex:  $\alpha$ -MHC) [71] e a redução do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente. Apesar de haver resultados controversos, níveis superiores do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente foram demonstrados em animais injetados com MCT, tanto na fase adaptativa quanto na não-adaptativa [72]. No estudo de Sabourin et al. [73], o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente resultou em aumento da amplitude de contração. Por outro lado, Benoist et al. [74] demonstraram aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente com redução da amplitude de contração, o que indica redução da sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Nesse mesmo estudo de Benoist et al. [74], o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente foi associado ao aumento do potencial de ação, em conjunto com o aumento da carga de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RS) e da liberação fracionária  $\text{Ca}^{2+}$  do RS. Isso

indica que o prolongamento do potencial de ação apresentado por cardiomiócitos desses animais pode promover maior influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do meio extracelular, resultando em aumento de sua biodisponibilidade.

Além disso, na HAP severa, os miócitos do VD apresentam maior tempo para o pico de contração. Esse resultado pode estar relacionado ao atraso na liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  do RS pelos receptores de rianodina tipo 2 (RyR2). Após 4 semanas da aplicação de MCT (60 mg/kg), foi possível observar redução do RNAm do RyR2, o que poderia refletir em redução da sua expressão [75].

O relaxamento celular também é prejudicado. O prolongamento do tempo para relaxamento celular é atribuído à diminuição da expressão e atividade da  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase do RS (SERCA2a), cuja função é sequestrar  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico para o RS [23, 75]. Além disso, também foi demonstrada a redução da expressão do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) em ratos tratados com MCT [76], o que influencia no relaxamento celular. Prejuízos na contração e no relaxamento celulares dificultam a capacidade dos miócitos em responder a estímulos elétricos progressivos e, conseqüentemente, do coração responder as demandas do organismo.

Quanto aos pulmões, sabe-se que a HAP severa (60 mg/kg) aumenta a massa desses [77, 78] e a espessura do septo alveolar e reduz a área dos alvéolos [79], o que prejudica o processo de hematose e contribui para os sintomas de dispneia. Adicionalmente, há prejuízos nos parâmetros funcionais dos pulmões, como a redução da conformidade dinâmica e do volume corrente, atrelado ao aumento do septo alveolar, gerando aumento compensatório da frequência respiratória [80, 81]. Essas alterações estão diretamente relacionadas ao aumento da inflamação, a qual reduz o número de alvéolos pulmonares, por meio de apoptose, e deteriora parte dos alvéolos restantes, induzindo colapsos e hemorragias [82, 83], o que resulta em funcionalidade pulmonar prejudicada.

Em relação ao músculo esquelético, sabe-se que a MCT promove prejuízos funcionais e estruturais nesse tecido. Após a administração de MCT (60 mg/kg), ocorre aumento dos níveis séricos de marcadores catabólicos, como interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), proteína C reativa (CRP) e miostatina; e locais, como a razão MAFbx/atrogina-1 associados à redução da massa e da AST muscular [84]. Adicionalmente, na HAP severa induzida por MCT, ocorre o aumento dos níveis circulantes de TNF- $\alpha$  de forma paralela ao de esfingosina – um segundo mensageiro capaz de induzir apoptose e

degradar fibras da musculatura esquelética [85].

No estudo de Moreira-Gonçalves et al. [86], a aplicação de MCT (60 mg/kg) promoveu redução da massa e da AST do músculo gastrocnêmio, o que contribuiu para a redução da tolerância ao exercício físico de corrida em esteira. Nesse sentido, Fujita et al. [87] reportaram que a aplicação de MCT (30 mg/kg) promove ativação das vias catabólicas ubiquitina-proteassoma e do macroautofagocitose, levando à atrofia muscular e, conseqüentemente, à redução da força muscular.

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

As terapias medicamentosas são essenciais para amenizar os efeitos deletérios da HAP sobre a qualidade de vida e a sobrevivência dos pacientes. Resumidamente, medicamentos são direcionados para a vasculatura pulmonar, como os bloqueadores dos canais de cálcio ( $Ca^{2+}$ ), antagonistas dos receptores de endotelina, agonistas do receptor e análogos de prostaciclina, que promovem redução da vasoconstrição e aumento da vasodilatação arterial. O tratamento de suporte aos pacientes envolve diuréticos, anticoagulantes e uso de oxigênio, que são inerentes à gravidade e ao estado em que o paciente se encontra [6].

O estudo de Hoeper et al. [88] demonstrou que a combinação de 2 medicamentos (terapia combinada) apresentou resultados mais eficientes em comparação ao uso de apenas um medicamento de forma isolada (monoterapia), no que concerne à mortalidade. Tais resultados refletem em maior tempo de sobrevivência dos pacientes [89].

Apesar da HAP ser praticamente incurável, pacientes que fizeram uso das terapias medicamentosas apresentaram valores hemodinâmicos, como as pressões sistólica e média, inferiores em comparação aos que não utilizaram. Além disso, apresentaram diminuição da progressão da doença e melhoras no teste de caminhada de 6 minutos, o que impactou positivamente na qualidade de vida desses indivíduos [90, 91]. As terapias não medicamentosas vêm sendo utilizadas dentro dos ambientes de reabilitação como forma coadjuvante ao tratamento essencial (medicamentoso). Dentre essas terapias, está a prática de exercícios físicos.

### 1.3.1. Exercício físico

A prática de exercício físico tem sido recomendada para indivíduos com doenças cardíacas [92] em função de seus múltiplos benefícios. Em pacientes com HAP, apesar de suas limitações ao exercício físico, tais como incapacidade do VD de aumentar o volume sistólico durante o exercício, perda de massa e força muscular e fadiga respiratória [93], a prática tem se mostrado benéfica [94, 95]. Nesse sentido, o exercício aeróbio pode aumentar a capacidade física e melhorar a qualidade de vida de pacientes com HAP, por reduzir a dispneia e a gravidade da fadiga [96, 97]. Por exemplo, pacientes com HAP severa apresentaram aumento do pico do consumo de oxigênio, além de redução da pressão arterial média (PAM) e da RVP após 15 semanas de intervenção com exercício aeróbio [98]. Todavia, a prática do exercício físico para pacientes com HAP ainda não consta nos guias [99] e ainda não há consenso sobre o tipo, a duração e a intensidade do exercício.

Há evidências de que o treinamento aeróbio contínuo de intensidade moderada atenua a resistência da artéria pulmonar, previne o remodelamento adverso do ventrículo e do pulmão direitos, além de promover benefícios à contração e ao  $Ca^{2+}$  intracelular transiente em miócitos isolados do VD durante a progressão da HAP induzida por MCT em ratos [100]. Essas adaptações resultaram em maior tolerância ao esforço físico por esses animais [100]. Adicionalmente, o exercício aeróbio intermitente (Corrida voluntária) é capaz de promover benefícios à estrutura tecidual do VD e à função contrátil de cardiomiócitos isolados do VD durante a progressão da HAP induzida por MCT em ratos [101, 102]. Da mesma forma, essas adaptações contribuíram positivamente para a tolerância ao esforço físico e para retardar o desenvolvimento da falha cardíaca nesses animais [101, 102].

Quanto ao treinamento com exercício resistido (TR), apesar do relato de que a intervenção com exercícios combinados (ex. Aeróbio, resistido e inspiratório) foi considerada segura para os pacientes, resultando em melhoras significativas na qualidade de vida dos participantes [103], pouco se sabe sobre os efeitos do TR nessa população. Especificamente, os efeitos do TR na prevenção e no tratamento da HAP não são bem conhecidos.

Sabe-se que o TR causa hipertrofia muscular e aumenta a força, resistência e coordenação intra e intermuscular [104, 105] ao promover síntese proteica por

estimular vias de sinalização de anabolismo e inibir vias de sinalização de catabolismo [105]. O TR tem sido usado como estratégia de prevenção e tratamento adjuvante de diversas doenças, como osteoporose, diabetes mellitus e hipertensão [106-109]. Dessa forma, considera-se importante investigar se o TR pode auxiliar na prevenção e no tratamento da HAP.

O modelo de TR “escalada em escada” foi preconizado por Hornberger e Farrar [110], com intuito de proporcionar adaptações hipertróficas, principalmente em músculos dos membros superiores e, em especial, nos músculos com predomínio de tipagem de fibra tipo IIA, provocando, assim, um aumento na força muscular. Por exemplo, o estudo de Padilha et al. [111] demonstrou que este modelo de TR promoveu hipertrofia dos músculos flexor longo do hálux e plantar. Adicionalmente, o estudo de Perrilhão et al. [112] demonstrou que ratas hipertensas submetidas a TR de escaladas em escada, por 12 semanas, obtiveram melhora da função cardíaca, sem alterar a massa do coração e o volume de cardiomiócitos. Além disso, o TR restaurou o conteúdo de colágeno das ratas hipertensas.

No modelo de HAP induzida por monocrotalina, entretanto, não foi encontrado, até o momento, nenhum estudo reportando efeitos do TR sobre a força muscular, a morfologia e a função cardiopulmonar em ratos.

### **1.3.2. Exercício físico prévio**

Outra pergunta importante é se o momento da prática do exercício físico pode interferir em seus benefícios durante o desenvolvimento da HAP. Por exemplo, considerou-se mais vantajoso iniciar o exercício aeróbio em até 24 horas após a indução da HAP, em comparação a iniciar após 2 semanas, no que concerne à preservação da massa muscular, aos parâmetros funcionais do VD ( $dP/dt_{max}$ , débito cardíaco e TAPSE) e às alterações prejudiciais da MCT sobre o colágeno, a razão  $\beta/a$ -MHC e ao RNAm do TNF-  $\alpha$ /IL-10 [86].

Nesse sentido, diferentemente dos estudos mencionados acima usando o modelo em questão, Colombo et al. [78] aplicaram um protocolo de treinamento aeróbio com duração de 5 semanas, no qual os animais realizaram o exercício em um período caracterizado como “pré-training” (2 semanas), receberam a aplicação de MCT e, posteriormente, treinaram por mais 3 semanas. Eles demonstraram que o

exercício aeróbio prévio preveniu o aumento da pressão arterial diastólica (PAD) final e a redução do volume intersticial, com aumento dos níveis capilares intramiocárdicos do VD. Ainda, também evidenciaram que o exercício preveniu o aumento da espessura da artéria pulmonar e da expressão da proteína GSK-3 $\beta$  (pró-hipertrofica) [78]. Portanto, o treinamento prévio com continuidade foi benéfico.

Uma intervenção com período de duração superior foi realizada por Nogueira-Ferreira et al. [77], em que os animais foram submetidos ao treinamento aeróbio prévio realizado em esteira (25 m/min por 60 min/dia), 5 vezes na semana, por 4 semanas, e, posteriormente, receberam a injeção de MCT (60 mg/kg) e treinaram por mais 4 semanas. Eles demonstraram que o exercício prévio preveniu a hipertrofia do VD, o aumento da PAD final, da AST dos cardiomiócitos, da fibrose cardíaca e da razão  $\beta/\alpha$ -MHC. Além disso, preveniu a redução da massa do músculo gastrocnêmio, todavia, não preveniu o aumento da massa do pulmão [77].

Adicionalmente, no estudo de Pacagnelli et al. [75], os animais foram submetidos ao treinamento aeróbio prévio por 10 semanas. Em seguida, realizaram a aplicação de MCT (60 mg/kg) e treinaram por mais 3 semanas. Posteriormente, permaneceram em destreinamento por 2 semanas, até o momento da eutanásia. Eles reportaram que o treinamento prévio preveniu a redução da velocidade do pico de fluxo cardíaco, o aumento da AST dos cardiomiócitos, entretanto, não preveniu alterações sobre o TA e TE do VD [75]. Novamente, observam-se benefícios do exercício prévio.

Contudo, os efeitos do TR prévio sobre a força muscular e a morfologia e função cardiopulmonar em ratos com HAP induzida por MCT não são conhecidos. Portanto, uma vez que, no modelo de HAP induzida por MCT, só existem estudos com exercício aeróbio [78, 113, 114], torna-se importante investigar se o TR prévio é capaz de prevenir os efeitos deletérios da HAP severa induzida por MCT sobre o coração, o pulmão e a musculatura esquelética.

Os resultados desta investigação podem ampliar evidências acerca dos benefícios, das possibilidades de intervenção e, assim, da relevância clínica de terapias coadjuvantes para a prevenção e tratamento da HAP.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

- Investigar os efeitos do treinamento resistido prévio de escalada em escada, com ou sem continuidade, sobre a força muscular, a morfologia e a função cardiopulmonar em ratos com HAP severa induzida por monocrotalina.

### 2.2. Específicos

- Investigar se, em ratos com HAP severa induzida por monocrotalina, o treinamento resistido prévio de escalada em escada, com ou sem continuidade afeta:
  - A força muscular;
  - A resistência da artéria pulmonar;
  - A função sistólica do ventrículo direito;
  - A morfometria do ventrículo direito, pulmão e bíceps braquial;
  - A função contrátil em miócitos isolados do ventrículo direito;
  - O cálcio intracelular transiente em miócitos isolados do ventrículo direito.

## 3. HIPÓTESES

**H0** - O treinamento resistido prévio de escalada em escada, com ou sem continuidade, não minimiza efeitos deletérios da HAP severa induzida por monocrotalina sobre a força muscular, a morfologia e a função cardiopulmonar em ratos.

**H1** - O treinamento resistido prévio de escalada em escada, com ou sem continuidade, minimiza efeitos deletérios da HAP severa induzida por monocrotalina sobre a força muscular, a morfologia e a função cardiopulmonar em ratos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Animais e desenho experimental

Todos os procedimentos foram realizados conforme os Princípios Éticos apresentados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG, sob o protocolo nº 95/2018.

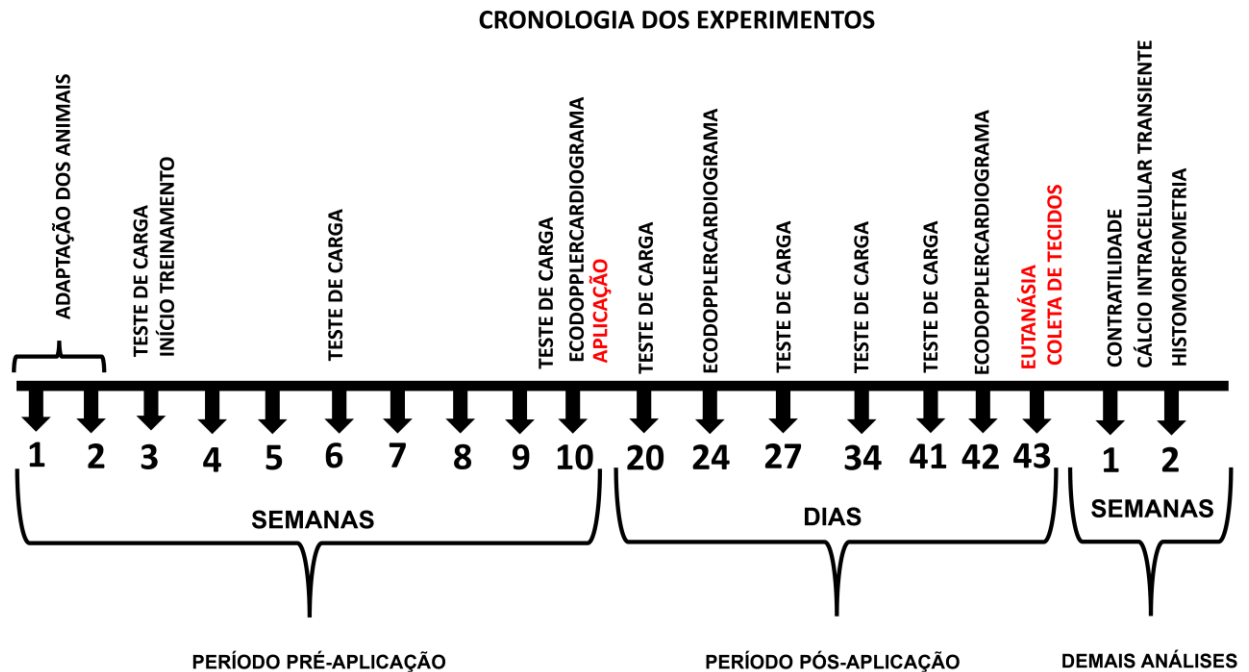
Foram utilizados 52 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com 6 semanas de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV. Os animais foram alojados em caixas de polietileno (até 5 animais por caixa) e receberam água filtrada e ração comercial *ad 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  $\sim 60\%$ . Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais:

- Sedentário Controle (SC, n=13), animais não submetidos ao TR que receberam solução salina;
- Sedentário Monocrotalina (SM, n=13), animais não submetidos ao TR que receberam monocrotalina;
- Treinado Monocrotalina Sem Continuidade (TMSC, n=13), animais submetidos ao TR prévio por 8 semanas que receberam monocrotalina e não continuaram o TR;
- Treinado Monocrotalina Com Continuidade (TMCC, n=13), animais submetidos ao TR prévio por 8 semanas que receberam monocrotalina e continuaram o TR por mais 6 semanas.

Observa-se que dos 13 animais em cada grupo, 7 foram usados para análises de contratilidade e cálcio intracelular transiente, enquanto os demais foram usados para análises histomorfométricas e ecocardiográficas.

A cronologia dos experimentos está ilustrada na figura 1. O protocolo de TR prévio foi realizado por um período de 8 semanas, 3x/semana. Em seguida, os animais dos grupos SM, TMSC e TMCC receberam a aplicação de MCT, enquanto os animais do grupo SC receberam o mesmo volume de salina. Os animais do grupo TMCC continuaram o TR (+ 6 semanas) e os do grupo TMSC permaneceram em suas caixas até a data de eutanásia. Os animais dos grupos SC e SM permanecerem em suas caixas

durante todo período experimental.



**Figura 1.** Cronologia dos experimentos

## 4.2. Protocolo de treinamento resistido

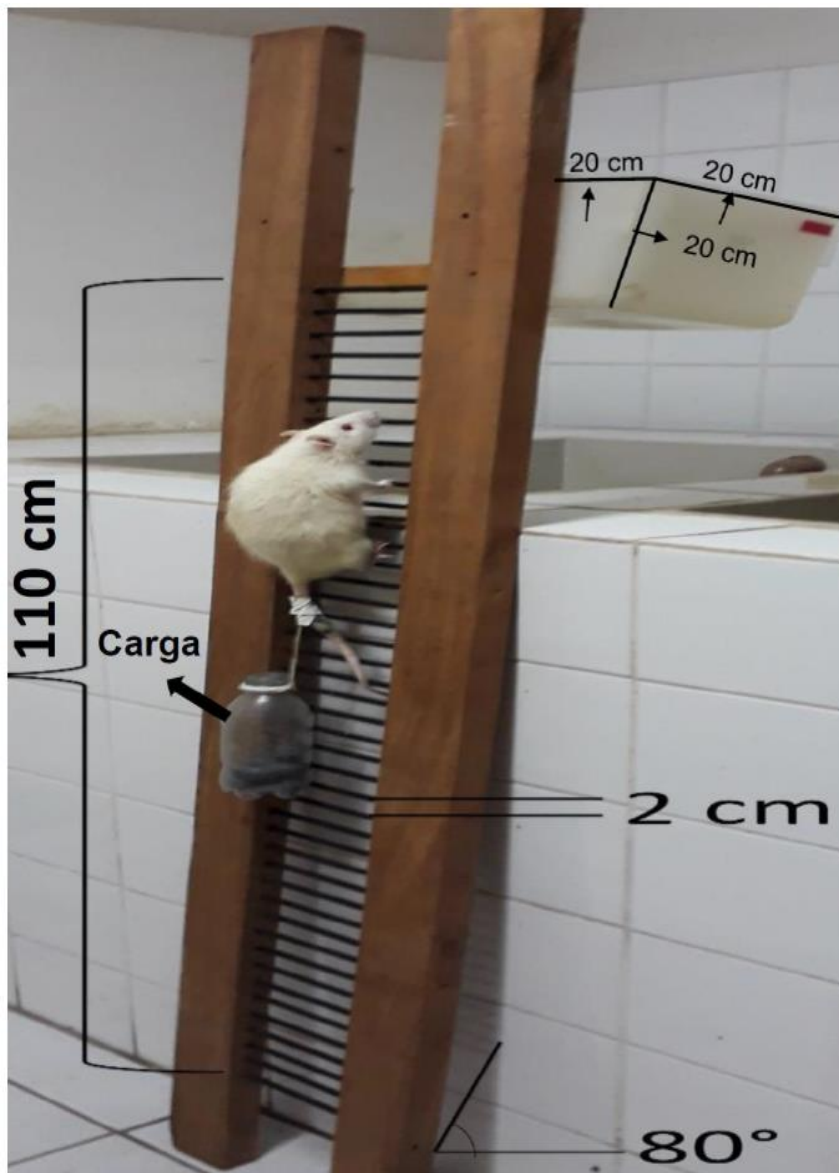
### 4.2.1. Familiarização à escada

O programa de TR foi realizado em uma escada vertical com 110 cm de altura, 18 cm de largura, 2 cm de distância entre os degraus e 80° de inclinação (Figura 2). O protocolo de exercício resistido foi adaptado de Hornberger e Farrar [110]. Inicialmente, todos os animais foram submetidos ao processo de familiarização à escalada durante duas semanas, 3 vezes por semana, em dias não consecutivos, da seguinte forma:

1) na primeira, o animal foi estimulado a realizar de 8 a 12 escaladas (repetições), e permanecer no topo da escada por 2 minutos em uma caixa de polipropileno; nessa semana, no primeiro dia, o animal permaneceu na caixa por 2 minutos e nos segundo e terceiro dias, adicionou-se a escalada até o topo, duas vezes, com intervalo de 2 minutos e

2) 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. Como critério para assentir que a familiarização foi realizada

com êxito, no último dia dessa segunda semana, o animal realizou 3 escaladas consecutivas, sem nenhum estímulo externo.



**Figura 2.** Imagem representativa do treinamento resistido.

#### 4.2.2. Teste de carga máxima carregada

O teste de carga máxima carregada foi realizado 48 horas após o processo de familiarização. Os animais foram pesados e a primeira escalada foi realizada com carga adicional de 75% da massa corporal do animal colocada no recipiente de carga. Subsequentemente, adicionou-se 30g ao recipiente a cada escalada, com intervalo de 2 minutos. Esse procedimento foi repetido sucessivamente até quando o animal não conseguisse realizar a escalada por completo. A carga carregada na última escalada foi

considerada a carga máxima e foi usada com um índice de força muscular. Para atualização da carga de treino, o teste de carga máxima carregada foi repetido nas 4<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas de TR; sendo que, após completar 20 dias de aplicação de monocrotalina ou de salina, o teste de carga máxima carregada passou a ser realizado semanalmente, até o momento da eutanásia.

#### **4.2.3. Protocolo de treinamento resistido**

As sessões de TR consistiram em quatro a nove escaladas carregando cargas progressivas. Durante as primeiras 4 escaladas, os animais carregaram 50%, 75%, 90% e 100% de sua carga máxima carregada. Subsequentemente, adicionou-se 30g a cada escalada até que o animal completasse nove escaladas. Se o animal não conseguisse realizar a escalada por completo, a fadiga era constatada para aquela sessão de TR, que era encerrada. Para contabilizar a série, o animal deveria realizar a escalada por completo. Esse procedimento foi realizado 3x/semana, por um período de 8 semanas pelo grupo TMSC e 14 semanas pelo grupo TMCC. O processo de atualização da carga máxima carregada foi realizado conforme descrito anteriormente.

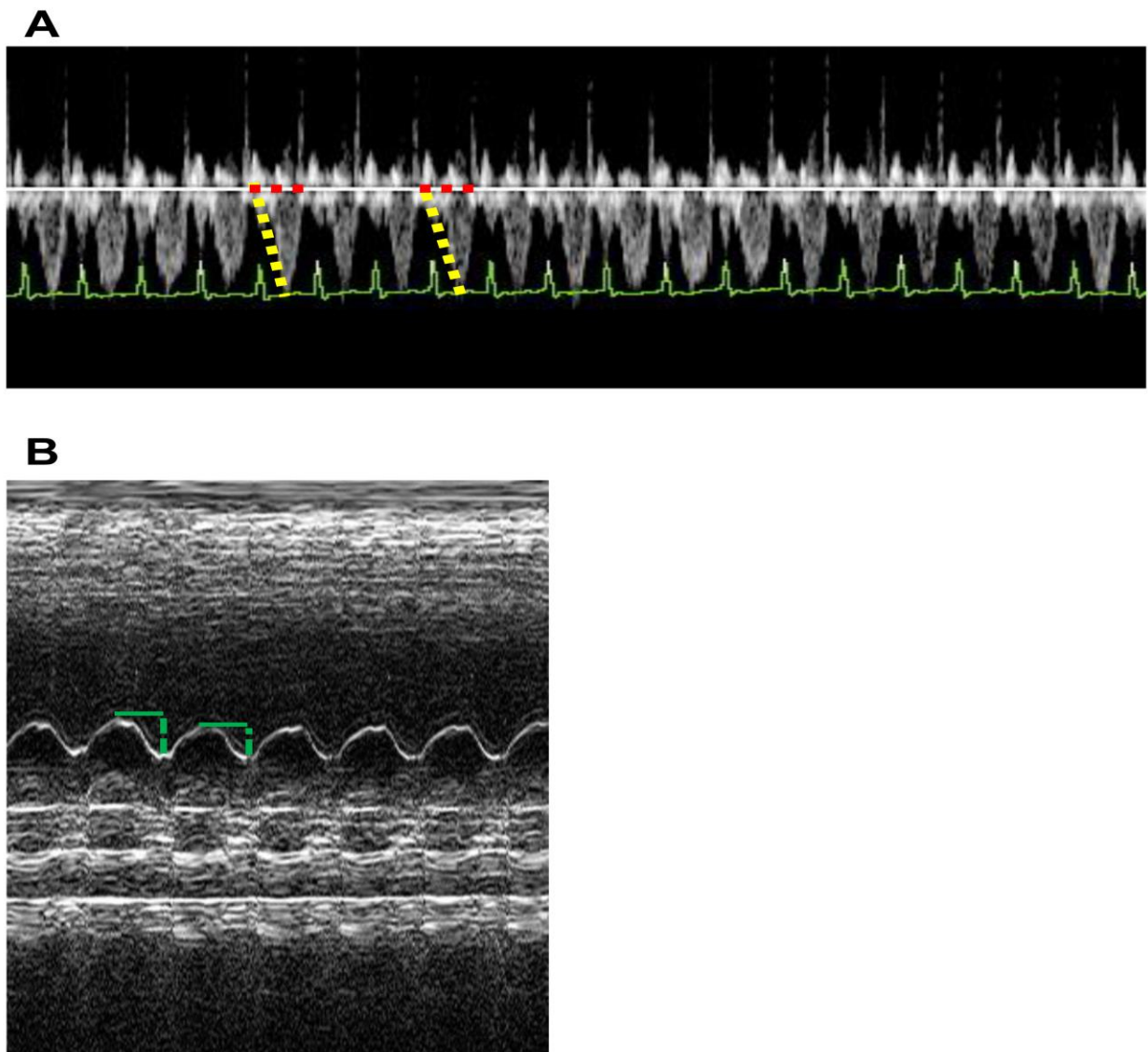
#### **4.3. Ecodopplercardiograma**

O primeiro ecodopplercardiograma foi realizado 24 horas após o teste de carga máxima carregada, ao final da 8<sup>o</sup> semana de TR. A segunda e a terceira avaliações foram realizadas 24 e 42 dias após a aplicação de monocrotalina ou salina. Em síntese, 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, Itatiaia-RJ, 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 tricúspede, 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. 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. As imagens representativas das análises podem ser observadas a seguir (figura 3).



**Figura 3.** Imagens representativas do ecodopplercardiograma. (A) (pontilhado amarelo) tempo de aceleração; (pontilhado vermelho) tempo de ejeção. (B) (pontilhado verde) TAPSE (*Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion*).

#### **4.4. Avaliação antropométrica**

Inicialmente, os animais foram pesados 3 vezes na semana, no mesmo horário, utilizando-se balança eletrônica (Rochelle, modelo 3252) para obtenção da medida da massa corporal. Após 20 dias da aplicação de monocrotalina ou salina, os animais passaram a ser pesados diariamente. A mensuração da medida do comprimento nasoanal foi realizada com o animal posicionado em decúbito dorsal, ao final de cada avaliação ecocardiográfica, enquanto ainda estavam sob efeito anestésico. O procedimento foi realizado de acordo com estudos anteriores [115], usando uma fita métrica. Posteriormente, calculou-se o índice de massa corporal (IMC) usando-se a fórmula:

$$\text{IMC} = \text{massa corporal} / \text{comprimento nasoanal}^2$$

#### **4.5. Indução da hipertensão arterial pulmonar**

A indução da hipertensão arterial pulmonar foi realizada por meio de 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) [58]. Os animais dos grupos controles receberam o mesmo volume de solução salina (NaCl 140 mM; pH 7,4).

#### **4.6. Coleta e processamento de amostras**

##### **4.6.1. Eutanásia**

Todos os animais sofreram eutanásia por decapitação, sem a utilização de anestesia prévia, em guilhotina própria para roedores (Insight EB 271, Ribeirão Preto, SP-Brasil). Os animais do grupo SM sofreram eutanásia assim que apresentaram sinais clínicos de falha cardíaca (ex. perda de 10 g do peso corporal de um dia para o outro e/ou dispneia, letargia, cianose). Os animais dos grupos SC, TMSC e TMCC sofreram eutanásia no tempo médio de falha cardíaca do grupo SM (43 dias após aplicação de monocrotalina). No entanto, os animais dos grupos TMSC e TMCC que apresentaram sinais clínicos de falha cardíaca foram submetidos à eutanásia e tiveram suas variáveis

analisadas, ainda que fosse anterior à média temporal de falha cardíaca do grupo SM.

Após a eutanásia, coração, pulmões, músculo bíceps braquial e a tíbia foram dissecados, pesados e armazenados, conforme análise de interesse.

#### **4.6.2. Processamento para histomorfometria**

Fragmentos do ventrículo e do pulmão direitos e do bíceps braquial foram armazenados em solução fixadora de Karnovsky por 24 horas. Em seguida, foram desidratados em série crescente de etanol e incluídos em metacrilato (Historesin, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Secções histológicas semisseriadas de 3  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidas utilizando micrótomo rotativo (RM 2255 Leica Biosystems, Nussloch, Germany). Para evitar a análise de áreas repetidas, utilizou-se uma a cada 10 secções, respeitando um intervalo mínimo de 30  $\mu\text{m}$  entre os cortes. Em seguida, as preparações histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE).

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.

#### **4.6.3. Isolamento de cardiomiócitos**

O processo de isolamento dos cardiomiócitos do ventrículo direito foi realizado conforme descrito previamente [101]. Após a eutanásia, o coração foi removido por meio de toracotomia, lavado em solução básica contendo 750 mM de  $\text{CaCl}_2$  (Solução A, item 4.6.3.1) para remoção do excesso de sangue, secado em papel toalha e, posteriormente, pesado em balança de precisão (AG 200, Gehaka, Brasil). Em seguida, o coração foi colocado em um sistema de perfusão (Langendorff adaptado) por meio da fixação da aorta ascendente com um fio de sutura em uma agulha de aço inoxidável modificada (cânula), com o fluxo constante da solução de isolamento (Solução A, item 4.6.3.1), até que os vasos sanguíneos estivessem totalmente limpos de sangue. Em

seguida, trocou-se a perfusão para solução livre de  $\text{Ca}^{2+}$  contendo 0,1 mM de ácido tetracético etilenoglicol (EGTA) (Solução B, item 4.6.3.1), durante 6 minutos, para o rompimento dos discos intercalares entre os miócitos e a quelação de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por fim, o coração foi perfundido com a solução contendo 30  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de colagenase tipo II (Worthington, EUA), 3  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de protease e 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$  (Solução C, item 4.6.3.1) durante 7-10 minutos para digestão das fibras colágenas extracelulares. Todas as soluções utilizadas no processo de isolamento foram oxigenadas ( $\text{O}_2$  100% - White Martins, Brasil) e mantidas em temperatura de 37°C.

Após a perfusão, os ventrículos foram separados dos átrios. Em seguida, o ventrículo direito foi dissecado do septo interventricular e do ventrículo esquerdo. Os músculos papilares e o tecido conjuntivo foram dissecados. Posteriormente, o ventrículo direito foi colocado em frasco contendo solução enzimática (Solução C, item 4.6.3.1) e esse frasco foi agitado moderadamente durante 5 minutos em “banho-maria” à temperatura de 37°C, sob oxigenação ( $\text{O}_2$  100% -White Martins, Brasil). A seguir, o conteúdo do frasco foi filtrado e centrifugado (3000 rpm) por 20 segundos. O sobrenadante foi removido e os cardiomiócitos foram suspensos em solução básica contendo 750 mM de  $\text{CaCl}_2$  (Solução A, item 4.6.3.1) e armazenados em refrigerador (5°C) até serem utilizados. Esse processo foi repetido 3 vezes. As análises descritas a seguir foram realizadas em até 3 horas após o isolamento.

#### **4.6.3.1. Composição das soluções para isolamento e análises de cardiomiócitos**

As soluções usadas para o isolamento dos miócitos do ventrículo direito foram feitas usando-se uma solução básica com água ultrapura (Milli-Q) e a seguinte composição (em mM): NaCl (130) – 7,6 g/L;  $\text{MgCl}_2$  (10) – 1,4 mL/L;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,33) – 0,055 g/L; KCl (5,4) – 0,4 g/L; ácido etanosulfônico – hidroxietil piperazina (HEPES) (10) – 1,19 g/L, taurina (20) – 2,5 g/L; creatina (10) – 1,31 g/L; glicose (10) – 1,8 g/L. Esta solução foi equilibrada para um pH de 7,4 com NaOH (5) e mantida em temperatura ambiente.

#### **Solução A:**

Para se fazer a solução de isolamento contendo  $\text{Ca}^{2+}$ , foram adicionados 375  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  (1M) 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 0,030g de colagenase e 0,003g de protease em 30 mL da solução básica.

**4.6.3.2. Solução de perfusão Tyrode**

Durante as análises de contratilidade celular e cálcio intracelular transiente, os miócitos do ventrículo direito foram banhados com solução Tyrode contendo (em mM): NaCl (137), KCl (5,4),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,33),  $\text{MgCl}_2$  (0,5), HEPES (5), glucose (5,6) e  $\text{CaCl}_2$  (1,8), pH 7,4 equilibrado com NaOH (5).

Para preparar a solução Tyrode, foram usadas uma solução estoque (10x),  $\text{CaCl}_2$ , glicose e água ultrapura (Milli-Q), conforme descrito abaixo.

**Solução estoque (1 Litro):** NaCl (80 g); HEPES (11,915 g);  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,515 g);  $\text{MgCl}_2$  (5 mL); KCl (4,025 g);

Para fazer um litro de solução Tyrode, foram adicionados 100 mL da solução estoque, 1 g de glicose e 1,8 mL de  $\text{CaCl}_2$  em de água ultrapura (Milli-Q), até completar 1 litro. Esta solução foi equilibrada para um pH de 7,4 com NaOH e mantida em temperatura ambiente.

**4.6.3.3. Incubação dos cardiomiócitos com indicador de fluorescência**

Os cardiomiócitos isolados foram incubados com o indicador fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$ , permeável à membrana plasmática, Fura-2 ácido aminopolicarboxílico (Fura-2AM, Thermo Fisher, Waltham, EUA). Esse marcador foi preparado com uma solução estoque a base de dimetilsulfóxido – DMSO (50  $\mu\text{g}$  de DMSO em 50  $\mu\text{g}$  de Fura-2 AM). Adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  dessa solução em 2 ml de meio celular (Células suspensas em solução A) contidos em tubo falcon envolvido com folha fina de alumínio. O tubo com as células foi

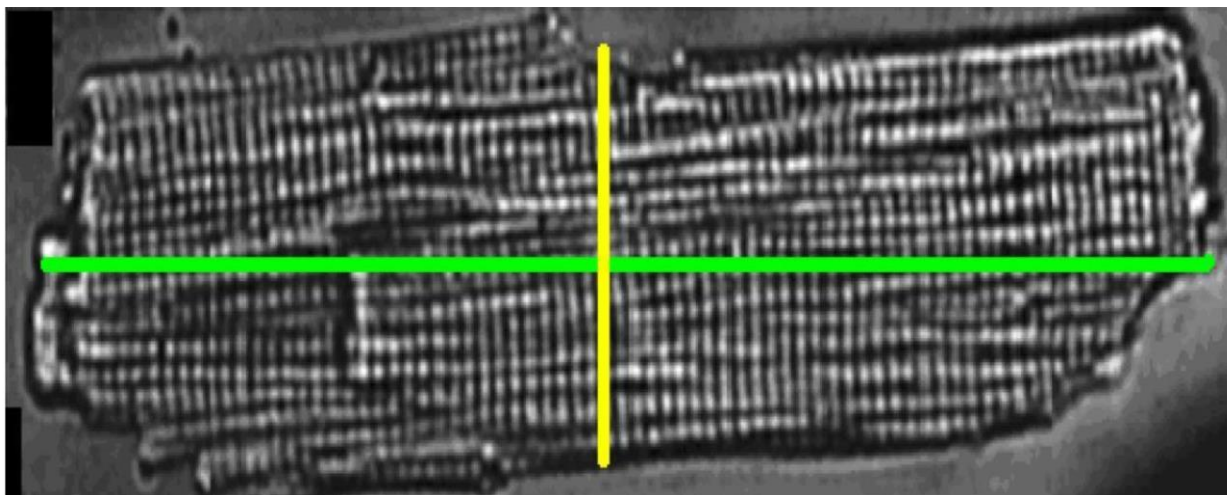
agitado suavemente em superfície plana por 10 minutos. Em seguida, o tubo com as células foi centrifugado por 20 segundos (3.000 rpm). Logo após, removeu-se o sobrenadante e os cardiomiócitos foram ressuspensos em 2 mL da solução contendo 750mM de  $\text{CaCl}_2$  (Solução A, item 4.6.3.1) e levados ao refrigerador ( $5^\circ\text{C}$ ) por 30 minutos. Esses procedimentos foram realizados sem exposição da solução e das células à luz.

#### **4.7. 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), matriz extracelular, e vasos sanguíneos, quantificados usando o Software Image J® (National Institute of Health, USA), enquanto 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).

#### **4.8. Mensuração de comprimento e largura celular**

Os cardiomiócitos isolados foram acomodados em uma câmara experimental e banhados por solução de perfusão (item 5.8.2) em temperatura ambiente ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ). As imagens das células foram captadas por uma câmara (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 captação 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 medidas em imagem de cardiomiócito ventricular de rato. As linhas indicam como foram obtidos o comprimento (verde) e largura (amarelo) (adaptado de Carneiro-Júnior. [116]).

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. Para isso, foram utilizadas 10 células de 6 animais, totalizando 60 células.

#### **4.9. 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, vasos sanguíneos, alvéolos pulmonares, alvéolos colapsados e alvéolos hemorrágicos. Usou-se, também, o Software Image J® (National Institute of Health, USA).

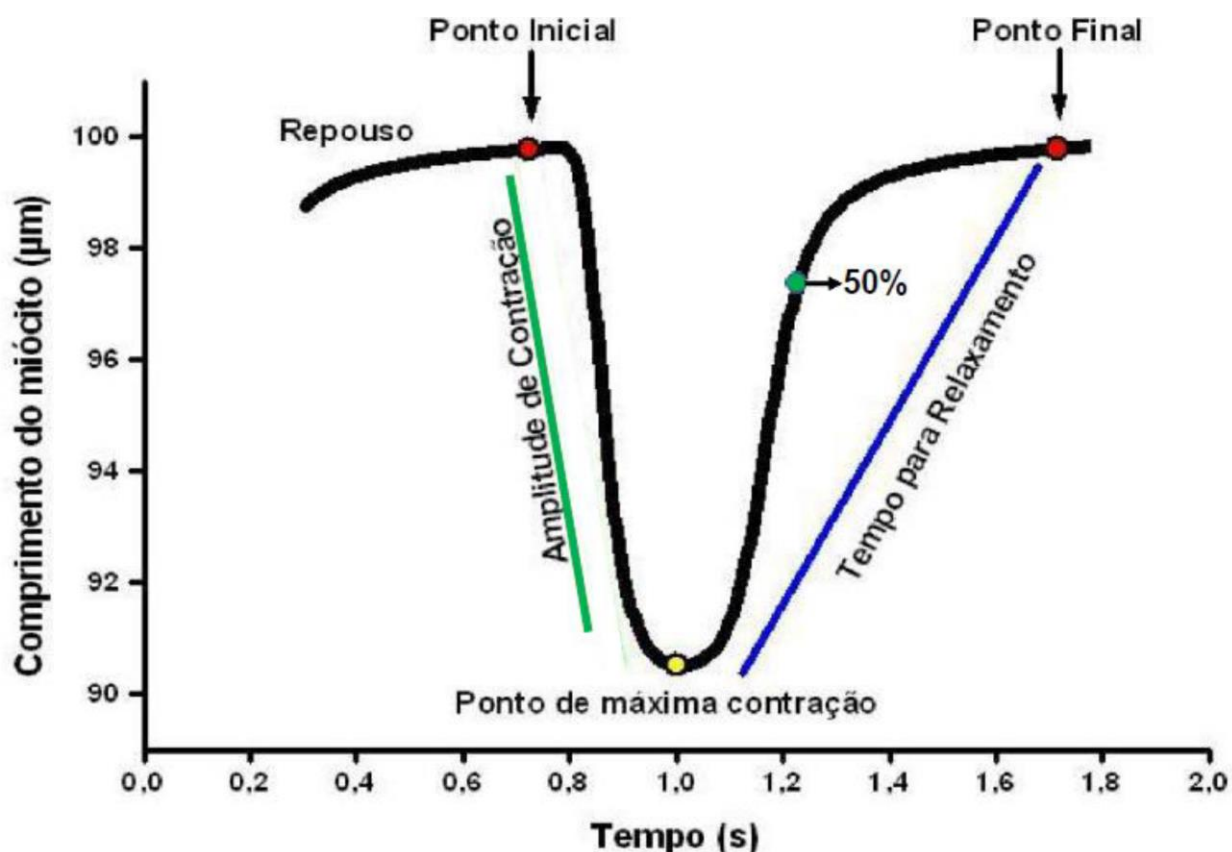
#### **4.10. Histomorfometria do bíceps braquial**

Para análise histomorfométrica do bíceps braquial direito, utilizou-se a orientação transversal. O tecido foi separado em duas regiões: a região distal foi utilizada para quantificar a porcentagem de fibras musculares (citoplasma e núcleo), matriz extracelular, e vasos sanguíneos, com análise realizada por meio do Software Image J® (National Institute of Health, USA), enquanto a região proximal foi utilizada para análise da área de secção transversal (30 células por animal), com análise realizada por meio

do Software Image ProPlus 4.5 (Media Cybernetics; Silver Spring, USA).

#### **4.11. Mensuração da contratilidade celular**

As contrações dos cardiomiócitos isolados do VD foram medidas por meio da técnica de alteração de comprimento celular, usando o sistema de detecção de bordas (Ionwizard, Ionoptix, Milton, MA, EUA) montado em um microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, Melville, NY EUA) equipado com uma lente objetiva de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, Melville, NY EUA), conforme descrito previamente [101]. Os cardiomiócitos isolados foram acomodados em uma câmara experimental montada em um microscópio invertido e banhados por solução Tyrode (Item 4.6.3.2) em temperatura de 37°C. Em seguida, foram visualizados em um monitor através de uma câmera (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada ao microscópio invertido, utilizando um programa de detecção de imagens (Ionwizard, Ionoptix, Milton, MA, EUA) com uma frequência de 240 Hz. Posteriormente, foram estimulados externamente nas frequências de 1, 3, 5 e 7 Hz (40 volts, duração de 5 ms) por meio de um estimulador elétrico (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, Milton, MA, EUA), com a utilização de um par de eletrodos de aço posicionados internamente na câmara. Os movimentos de contração e relaxamento dos cardiomiócitos foram capturados pelo sistema de detecção de bordas (Ionwizard, Ionoptix, Milton, MA, EUA) e armazenados para análise posterior. Foram utilizados, para mensuração das contrações, somente os cardiomiócitos que estavam com as bordas e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso, sem apresentar contrações espontâneas. Foram analisados amplitude de contração (variação percentual do comprimento celular em repouso), tempo para o pico de contração (tempo compreendido desde a estimulação elétrica até a amplitude máxima de contração), velocidade de contração (amplitude total / tempo para o pico de contração) e tempo para 50% do relaxamento (tempo compreendido desde a amplitude máxima de contração até 50% do relaxamento) (Figura 5).



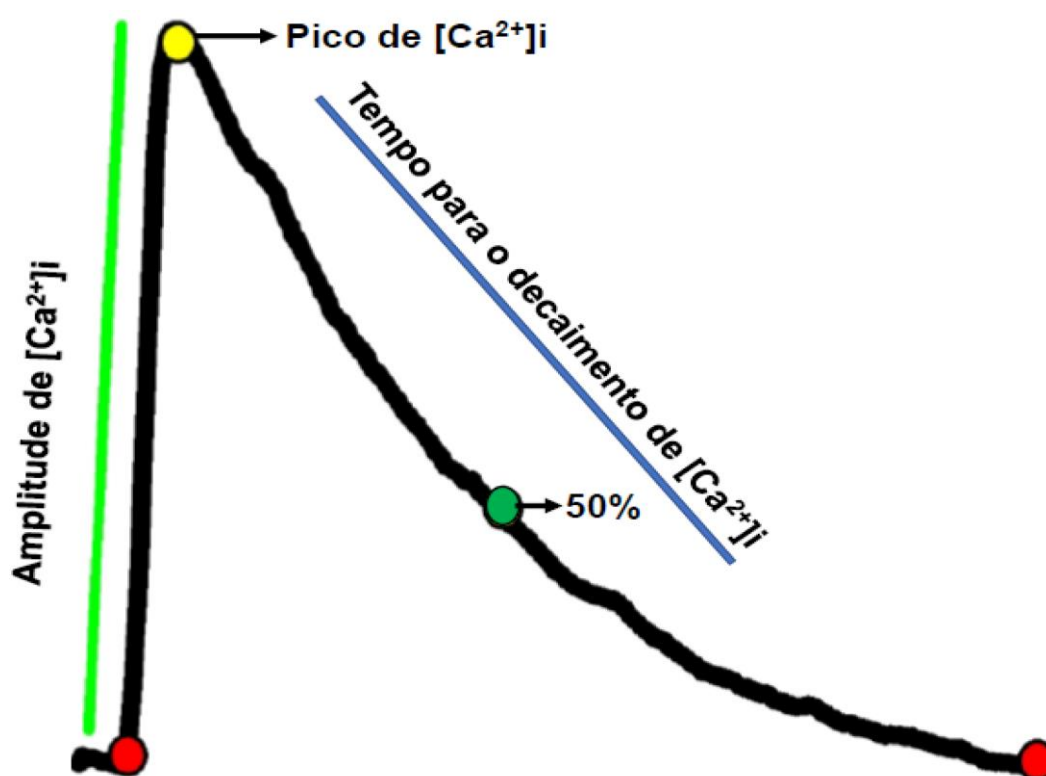
**Figura 5.** Traçado representativo da contração celular (1 Hz) e dos respectivos parâmetros da contração analisados (adaptado de Carneiro-Júnior. [117]).

#### 4.12. Mensuração do cálcio intracelular transiente

As medidas do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente dos cardiomiócitos isolados do VD foram realizadas conforme previamente descrito [101]. Essas medidas foram feitas utilizando um microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, Melville, NY EUA) equipado com uma lente objetiva de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, Melville, NY EUA).

O  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente foi medido utilizando um sistema de excitação dupla para detecção da fluorescência excitada por luz UV com comprimento de 340 e 380 nm (Ionoptix, Milton, MA, EUA). Os cardiomiócitos incubados com Fura-2 foram colocados em uma câmara experimental, montada em um microscópio invertido, e foram banhadas por solução Tyrode (Item 4.6.3.2) em temperatura ambiente. O cardiomiócito em avaliação foi posicionado dentro de uma janela ajustável, com bordas aparentes, e estimulados externamente nas frequências de 1, 3, 5 e 7 Hz (40 volts, duração de 5 ms), usando-se um estimulador elétrico (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, Milton, MA, EUA). A emissão da 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. Os registros foram feitos em até 4 horas após o isolamento dos cardiomiócitos. Foram analisados a amplitude do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente (340:380), o tempo para o pico de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente (tempo compreendido desde a estimulação elétrica até a fluorescência máxima), velocidade para o pico de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente (amplitude total / tempo para o pico  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente) e tempo para 50% do decaimento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente (tempo compreendido desde a fluorescência máxima até metade do retorno à fluorescência basal) (Figura 6).



**Figura 6.** Traçado representativo do cálcio intracelular transiente (1 Hz) e os respectivos parâmetros analisados (adaptado de Carneiro-Júnior. [117]).

#### 4.13. Análise estatística

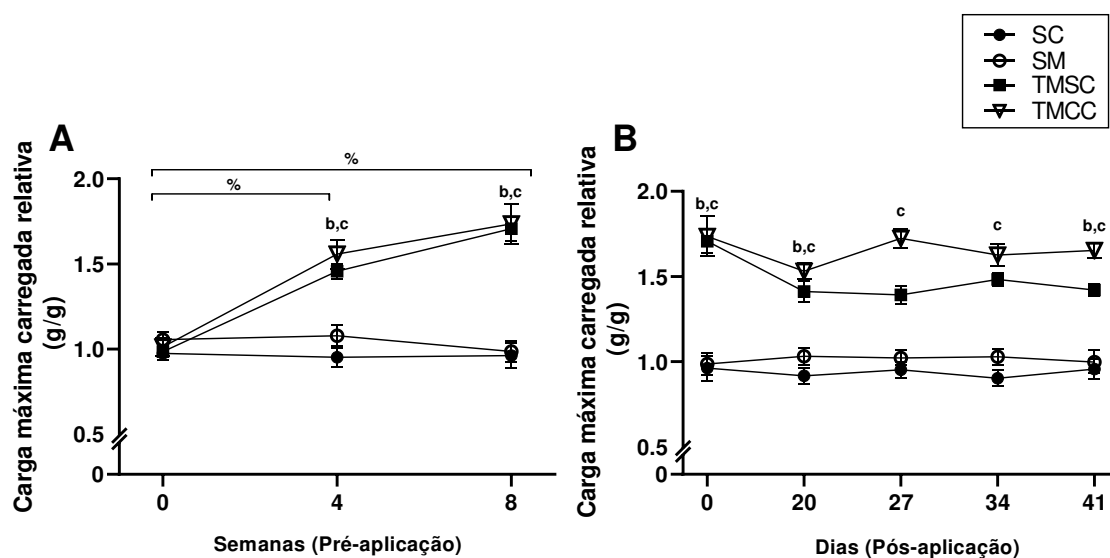
Os dados foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk para verificar a sua distribuição. Para os dados paramétricos, usou-se a análise de variância de uma entrada (ANOVA one-way), para avaliação entre grupos, seguida do *post hoc* de Tukey para comparações múltiplas, quando necessário. Para os dados não paramétricos, utilizou-se o Kruskal-wallis, seguido do *post hoc* de Dunn's para as comparações múltiplas, quando necessário. As avaliações temporais intragrupos foram realizadas usando

ANOVA de medidas repetidas, seguido do *post hoc* de Tukey, quando necessário, para os dados paramétricos. Para os dados não paramétricos, utilizou-se o teste de Friedman, seguido do *post hoc* de Dunn's, quando necessário. Para avaliação da porcentagem de células que responderam à frequência de 7 Hz, foi utilizado o teste qui-quadrado de Pearson ( $X^2$ ). 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. Força muscular

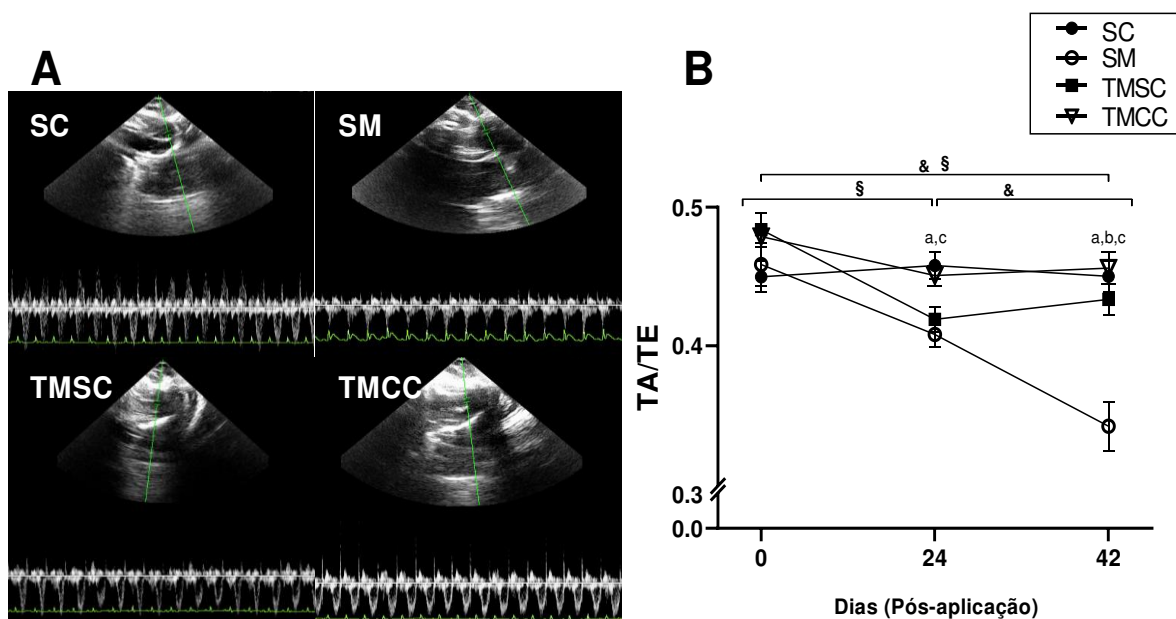
A figura 7 apresenta os valores de força muscular ao longo do período experimental. Antes da aplicação de monocrotalina, no início do experimento (semana 1), não houve diferença entre os grupos para carga máxima carregada relativa (Fig. 7. A). Porém, nas semanas 4 e 8, os grupos treinados (TMSC e TMCC) apresentaram aumento desse parâmetro em relação à semana 1, e também em relação ao grupo SM ( $p \leq 0,05$ ). No período pós aplicação, a carga máxima carregada relativa (Fig 7. B) continuou maior nos grupos treinados que no grupo SM ( $p \leq 0,05$ ). No entanto, o grupo TMSC não foi diferente do grupo SM nos dias 27 e 34 após a aplicação de monocrotalina ( $p > 0,05$ ). Não houve diferença de carga máxima carregada relativa entre os grupos SC e SM durante o período experimental ( $p > 0,05$ ).



**Figura 7.** Força muscular. (A) Carga máxima carregada relativa pré-aplicação de monocrotalina; (B) Carga máxima carregada relativa pós-aplicação de monocrotalina. SC, sedentário controle; SM, sedentário monocrotalina; TMSC, treinado monocrotalina sem continuidade; TMCC, treinado monocrotalina com continuidade. Anova one-way com *post hoc* de Tukey. Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn's para Força relativa na 8ª semana e nos dias 0, 20, 27 e 34. Valores são média  $\pm$  EPM de 8-11 animais por grupo. Valor de  $p \leq 0,05$ . <sup>b</sup>SM vs TMSC; <sup>c</sup>SM vs TMCC; <sup>d</sup>TMSC vs TMCC. Teste de Friedman, <sup>%</sup> TMSC e TMCC vs semana 0 e semana 4.

## 5.2. Resistência da artéria pulmonar

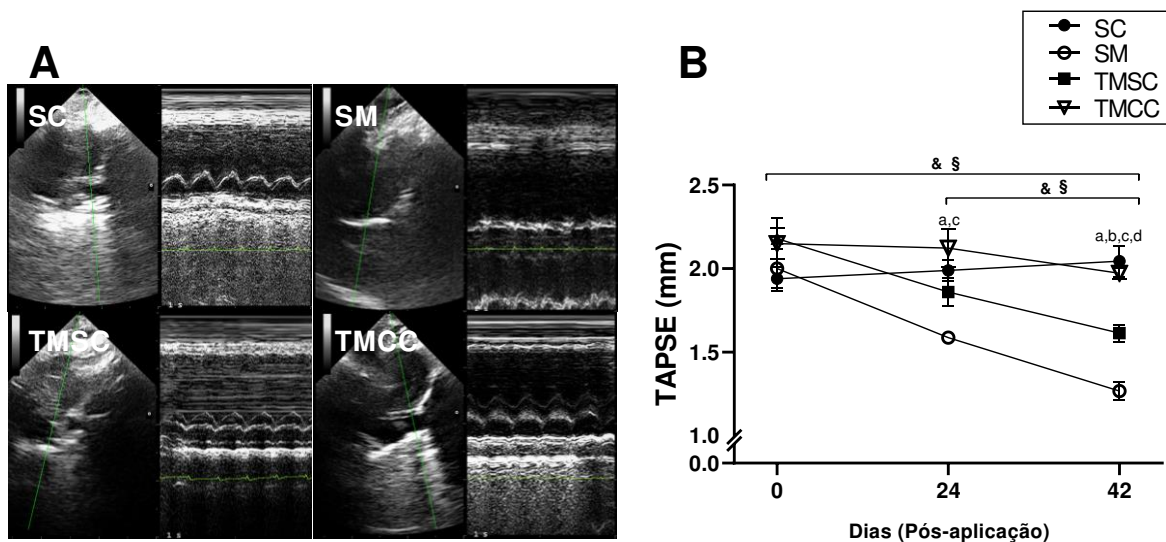
Os resultados da resistência da artéria pulmonar (razão TA/TE) são apresentados na figura 8. Não houve diferença entre os grupos para a razão TA/TE antes da aplicação de monocrotalina, após o TR prévio (Fig. 8 B). Após a aplicação de monocrotalina ou salina, o grupo SC apresentou manutenção da TA/TE nos dias 24 e 42 ( $p > 0,05$ ). Todavia, o grupo SM teve redução no dia 42, em comparação ao dia 24 ( $p = 0,019$ ) e ao dia 0 ( $p = 0,014$ ). Além disso, o grupo SM apresentou menor TA/TE, em relação ao grupo SC, nos dias 24 ( $p = 0,004$ ) e 42 ( $p < 0,0001$ ). O grupo TMSC apresentou redução nos dias 24 e 42 ( $p \leq 0,05$ ), em relação ao dia 0, entretanto, apresentou manutenção entre os dias 24 e 42 ( $p > 0,05$ ) e maior TA/TE, em relação ao grupo SM, no dia 42 ( $p = 0,001$ ). O grupo TMCC manteve os valores de TA/TE nos dias 24 e 42 pós-aplicação ( $p > 0,05$ ), em relação ao dia 0, e apresentou valores superiores, em relação ao grupo SM, nos dias 24 ( $p = 0,015$ ) e 42 ( $p < 0,0001$ ).



**Figura 8.** Resistência da artéria pulmonar. (A) Imagem representativa do fluxo na artéria pulmonar medido por Doppler pulsátil. Tempo de aceleração (TA) e tempo de ejeção (TE) do fluxo na artéria pulmonar. (B) Razão TA/TE. SC, sedentário controle; SM, sedentário monocrotalina; TMSC, treinado monocrotalina sem continuidade; TMCC, treinado monocrotalina com continuidade. Valores são média  $\pm$  EPM de 5-6 animais por grupo. Anova one-way seguido de *post hoc* de Tukey. Anova de medidas repetidas seguido de *post hoc* de Tukey. Valor de  $P \leq 0,05$ . Anova one-way, <sup>a</sup>SC vs SM; <sup>b</sup>SM vs TMSC; <sup>c</sup>SM vs TMCC. Anova de medidas repetidas, & SM vs dias 0 ou 24; §TMSC vs dia 0.

### 5.3. Função sistólica do ventrículo direito

Os valores da função sistólica do ventrículo direito estão demonstrados na figura 9. Não houve diferença entre os grupos para a TAPSE após o TR prévio ( $p > 0,05$ ) e antes da aplicação de monocrotalina (Fig. 9 B). Após a aplicação de monocrotalina ou salina, o grupo SM apresentou tendência à redução ( $p = 0,054$ ) da TAPSE, no dia 24, em comparação ao dia 0. Entretanto, no dia 42, o grupo SM apresentou redução da TAPSE, em relação ao dia 24 ( $p = 0,019$ ) e ao dia 0 ( $p = 0,012$ ). Ademais, o grupo SM teve valores menores que os do grupo SC, nos dias 24 ( $p = 0,021$ ) e 42 ( $p < 0,0001$ ). O grupo TMSC, no dia 42, apresentou redução da TAPSE, em comparação aos dias 24 e 0 ( $p = 0,021$ ) e em relação ao grupo TMCC ( $p = 0,005$ ), todavia, apresentou valor maior que o do grupo SM ( $p = 0,009$ ) no dia 42. O grupo TMCC manteve os valores da TAPSE nas três avaliações ( $p > 0,05$ ) e apresentou valores superiores aos do grupo SM nos dias 24 ( $p = 0,009$ ) e 42 ( $p < 0,0001$ ) e, em relação ao grupo TMSC, no dia 42 ( $p < 0,005$ ).



**Figura 9.** Função sistólica do ventrículo direito. (A) Imagem representativa da excursão sistólica do plano anular tricúspide (TAPSE). (B) Valores médios da TAPSE. SC, sedentário controle; SM, sedentário monocrotalina; TMSC, treinado monocrotalina sem continuidade; TMCC, treinado monocrotalina com continuidade. Valores são média  $\pm$  EPM de 5-6 animais por grupo. Anova one-way seguido de *post hoc* de Tukey. Kruskal-wallis seguido de *post hoc* de Dunn's (TAPSE no dia 24). Anova de medida repetidas seguido de *post hoc* de Tukey. Teste de Friedman seguido de *post hoc* de Dunn's (para o grupo TMCC). Valor de  $P \leq 0,05$ . Anova one-way ou Kruskal-Wallis, <sup>a</sup>SC vs SM; <sup>b</sup>SM vs TMSC; <sup>c</sup>SM vs TMCC; <sup>d</sup>TMSC vs TMCC; ANOVA de medidas repetidas ou Teste de Friedman, <sup>&</sup>SM vs dias 0 e 24; <sup>§</sup>TMSC vs dias 0 e 24.

## **5.4. Morfometria do ventrículo e do pulmão direitos e do bíceps braquial**

### **5.4.1. Massa corporal, índice de massa corporal, massa dos tecidos e suas razões**

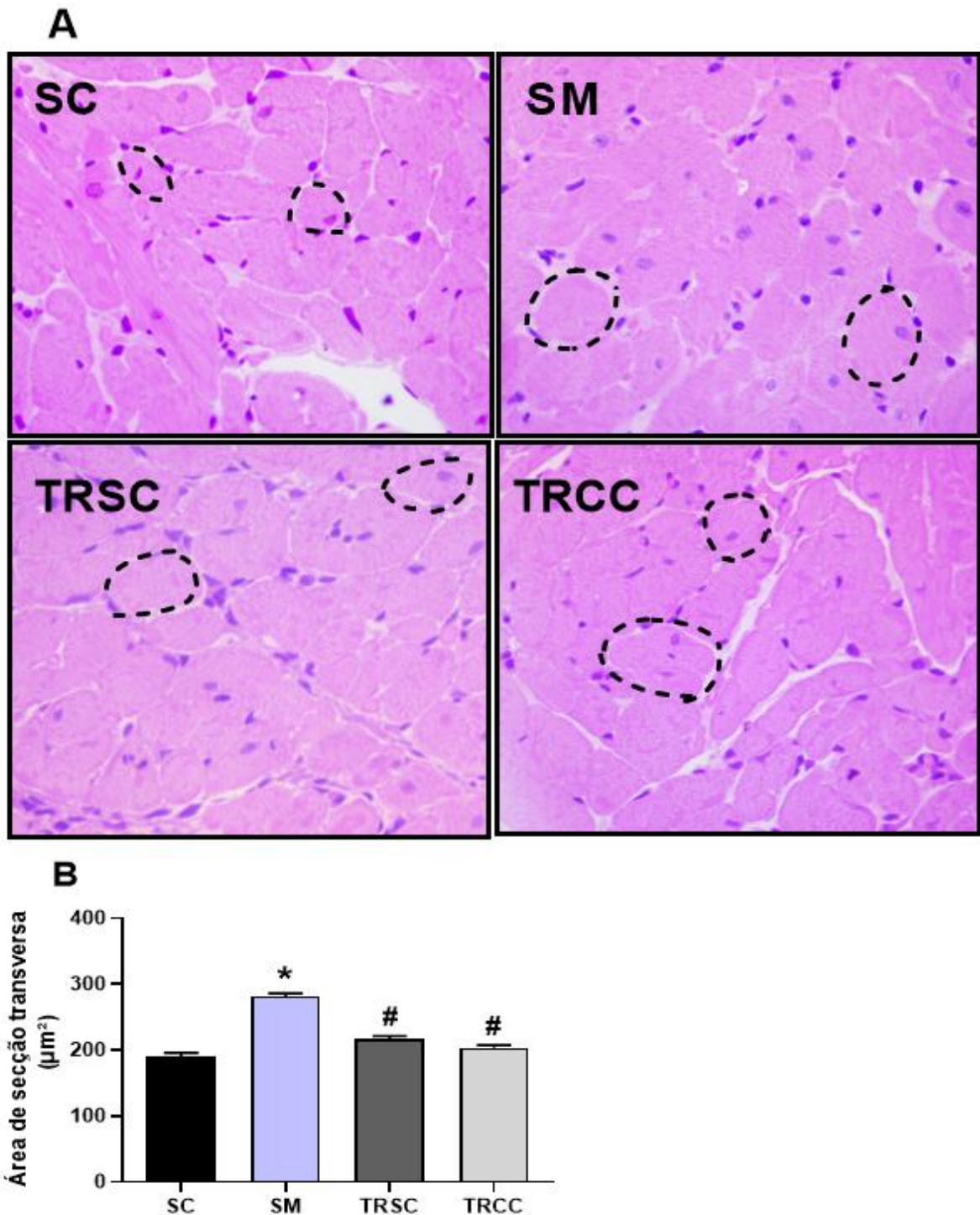
Não houve diferença entre os grupos para a massa corporal inicial (Tabela 1). A aplicação de monocrotalina reduziu ( $p < 0,05$ ) a massa corporal final, no grupo SM, em comparação ao grupo SC. O TR prévio não preveniu tal redução ( $p > 0,05$ ) nos grupos TMSC e TMCC. Ademais, o IMC final não foi diferente entre os grupos ( $p > 0,05$ ). A aplicação da monocrotalina aumentou as massas do coração ( $p < 0,0001$ ), do VD ( $p < 0,0001$ ) e do pulmão direito ( $p < 0,0001$ ), e reduziu a massa do bíceps braquial ( $p = 0,0001$ ) no grupo SM em comparação ao grupo SC. Por outro lado, o TR prévio preveniu as alterações das massas do coração e do VD nos grupos TMSC e TMCC, contudo, em relação ao pulmão direito, observou-se efeito preventivo somente no grupo TMCC ( $p = 0,001$ ). Além disso, esse mesmo grupo teve menor massa do VD que o TMSC ( $p = 0,008$ ). Esses achados podem ser observados tanto nos valores absolutos quanto nos valores normalizados pelo comprimento da tíbia.

**Tabela 1.** Massa corporal, índice de massa corporal, massa dos órgãos e razões.

Parâmetros	SC	SM	TMSC	TMCC
Massa Inicial (g)	244,00 ± 6,49	240,92 ± 6,33	260,31 ± 5,67	242,46 ± 4,78
Massa Final (g)	433,38 ± 16,00	375,85 ± 12,06*	376,00 ± 9,77	376,69 ± 8,23
IMC Final (g/m <sup>2</sup> )	0,66 ± 0,02	0,70 ± 0,04	0,65 ± 0,01	0,67 ± 0,03
Massa Coração (g)	1,31 ± 0,03	1,65 ± 0,02*	1,50 ± 0,05 <sup>#</sup>	1,38 ± 0,04 <sup>#</sup>
Massa VD (g)	0,17 ± 0,00	0,44 ± 0,01*	0,36 ± 0,02 <sup>#</sup>	0,28 ± 0,01 <sup>#†</sup>
Massa PD (g)	1,36 ± 0,04	2,72 ± 0,24*	2,24 ± 0,16	1,70 ± 0,09 <sup>#</sup>
Massa Bíceps braquial (g)	0,23 ± 0,01	0,18 ± 0,01*	0,21 ± 0,01 <sup>#</sup>	0,22 ± 0,00 <sup>#</sup>
Coração/Comprimento Tíbia (mg/mm)	31,28 ± 1,10	39,20 ± 0,77*	35,36 ± 0,60 <sup>#</sup>	32,67 ± 0,86 <sup>#</sup>
VD/Comprimento Tíbia (mg/mm)	4,12 ± 0,10	10,33 ± 0,27*	8,60 ± 0,44 <sup>#</sup>	6,74 ± 0,33 <sup>#†</sup>
PD/Comprimento Tíbia (mg/mm)	32,57 ± 0,82	64,66 ± 6,21*	53,05 ± 3,89	40,32 ± 2,07 <sup>#</sup>
Bíceps braquial/Comprimento Tíbia (mg/mm)	5,41 ± 0,11	4,24 ± 0,17*	4,88 ± 0,12 <sup>#</sup>	5,29 ± 0,05 <sup>#</sup>

SC, sedentário controle; SM, sedentário monocrotalina; TMSC, treinado monocrotalina sem continuidade; TMCC, treinado. IMC, índice de massa corporal; VD, ventrículo direito; PD, pulmão direito. Valores são média ± EPM de 13 animais por grupo (massa inicial e massa final). Valores são média ± EPM de 5-6 animais por grupo (para as demais análises). Anova one-way seguido de *post hoc* de Tukey. Valor de  $p \leq 0,05$ . \* vs SC; # vs SM; † vs TMSC.

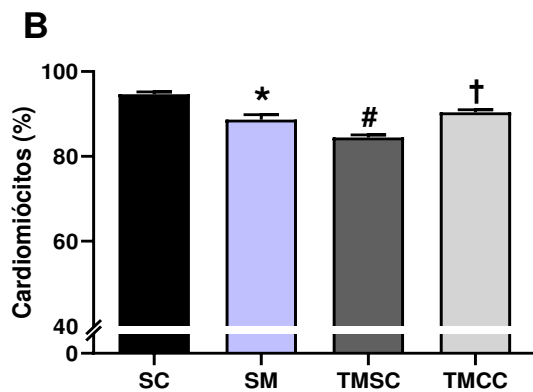
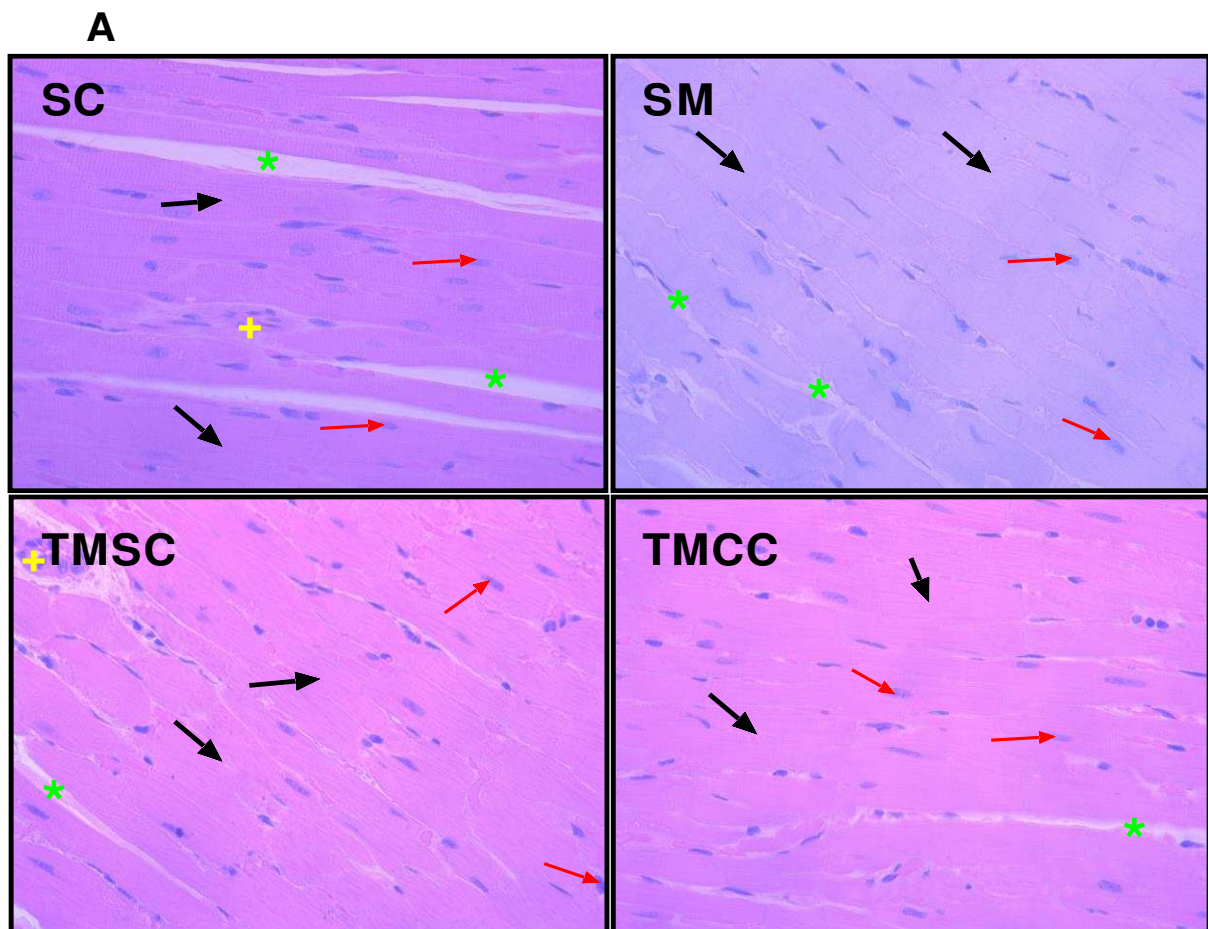
## 5.4.2. Histomorfometria do ventrículo direito



**Figura 10.** Área de secção transversa de miócitos do ventrículo direito. (A) Fotomicrografia representativa do ventrículo direito (Hematoxilina & Eosina), em corte transversal. SC, sedentário controle; SM, sedentário monocrotalina; TMSC, treinado monocrotalina sem continuidade; TMCC, treinado monocrotalina com continuidade. (Pontilhado preto) representação da medida da área de secção transversa dos cardiomiócitos. (B) Área de secção transversa dos cardiomiócitos. Valores são média  $\pm$  EPM de 20-30 células por animal em cada grupo (4-5 animais por grupo). Kruskal- Wallis seguido de *post hoc* de Dunn's. Valor de  $P \leq 0,05$ . \* vs SC; # vs SM; † vs TMSC.

A figura 10 apresenta a área de secção transversa de miócitos do ventrículo direito. É possível observar que a aplicação de monocrotalina aumentou a área de secção transversa dos cardiomiócitos no grupo SM em comparação ao grupo SC ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 10. B). Nesse caso, o treinamento prévio preveniu tal aumento nos dois grupos TMSC e TMCC ( $p < 0,0001$ ).

A imagem representativa do ventrículo direito em orientação longitudinal pode ser visualizada na figura 11. Observa-se que a aplicação de monocrotalina reduziu a porcentagem de cardiomiócitos do ventrículo direito no grupo SM em comparação ao grupo SC ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 11. B). Além do mais, o TR prévio não preveniu tal redução, uma vez que o grupo TMSC apresentou valores inferiores aos dos grupos SM e TMCC ( $p < 0,0001$ ); e o grupo TMCC não foi diferente do grupo SM ( $p > 0,05$ ).



**Figura 11.** Histomorfometria do ventrículo direito. (A) Fotomicrografia representativa do ventrículo direito (Hematoxilina & Eosina), em corte longitudinal. SC, sedentário controle; SM, sedentário monocrotalina; TMSC, treinado monocrotalina sem continuidade; TMCC, treinado monocrotalina com continuidade. (Seta preta) Citoplasma; (Seta vermelha) Núcleo; (Asterisco verde) Matriz extracelular; (Cruz amarela) vaso sanguíneo. (B) Porcentagem de cardiomiócitos. Valores são média  $\pm$  EPM de 10 imagens por animal em cada grupo (5-6 animais por grupo). Kruskal-Wallis seguido de *post hoc* de Dunn's. Valor de  $P \leq 0,05$ . \* vs SC; # vs SM; † vs TMSC.

Na tabela 2, estão apresentadas as proporções histomorfométricas entre os elementos teciduais avaliados no ventrículo direito. A aplicação de monocrotalina reduziu os percentuais de citoplasma ( $p < 0,05$ ), de núcleo ( $p < 0,0001$ ) e de vaso sanguíneo ( $p < 0,006$ ), e aumentou o percentual de matriz extracelular ( $p < 0,0001$ ) no grupo SM em comparação ao grupo SC. O TR prévio, no grupo TMSC, reduziu o percentual de citoplasma, e aumentou os percentuais de matriz extracelular e de vaso sanguíneo em comparação aos grupos SM e TMCC. O TR prévio, no grupo TMCC, foi capaz de prevenir a redução do percentual de vaso sanguíneo ( $p < 0,0001$ ), mas não foi capaz de prevenir as alterações sobre os percentuais de citoplasma e matriz extracelular, quando comparado ao grupo SM ( $p > 0,05$ ). Entretanto, o TR prévio preveniu a redução do percentual de núcleo nos dois grupos TMSC e TMCC ( $p < 0,0001$ ), sendo mais evidente no grupo TMCC do que no outro ( $p = 0,0011$ ).

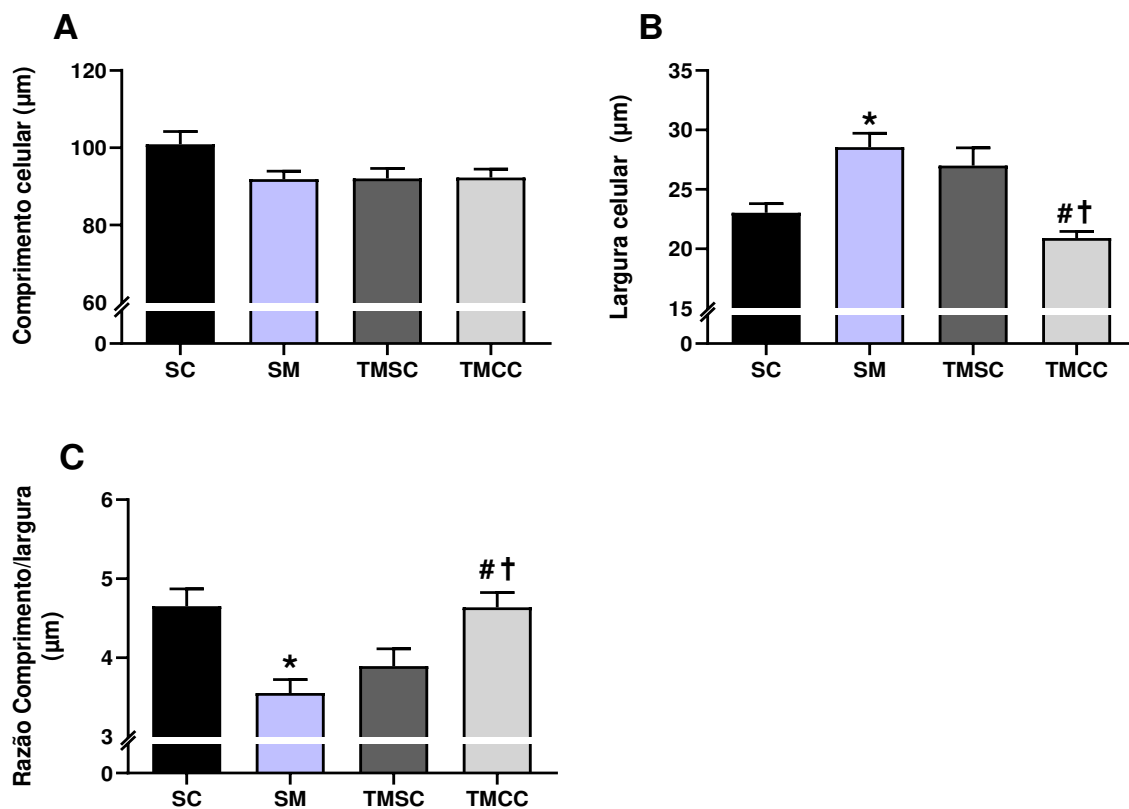
**Tabela 2.** Proporções histomorfométricas entre os elementos teciduais do ventrículo direito.

Parâmetros	SC	SM	TMSC	TMCC
Citoplasma (%)	88,62 ± 0,65	84,81 ± 1,06*	78,67 ± 0,66#	83,20 ± 0,60†
Núcleo (%)	6,02 ± 0,24	3,85 ± 0,18*	5,76 ± 0,23#	7,19 ± 0,22#†
Matriz extracelular (%)	4,78 ± 0,51	11,28 ± 1,12*	13,36 ± 0,54#	8,84 ± 0,60†
Vaso sanguíneo (%)	0,58 ± 0,16	0,05 ± 0,02*	2,21 ± 0,25#	0,77 ± 0,10#†

SC, sedentário controle; SM, sedentário monocrotalina; TMSC, treinado monocrotalina sem continuidade; TMCC, treinado continuidade. Valores são média ± EPM de 10 imagens por animal em cada grupo (5-6 animais por grupo). Kruskal-Wallis seguido de *post hoc* de Dunn's. Valor de P ≤ 0,05. \* vs SC; # vs SM; † vs TMSC.

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

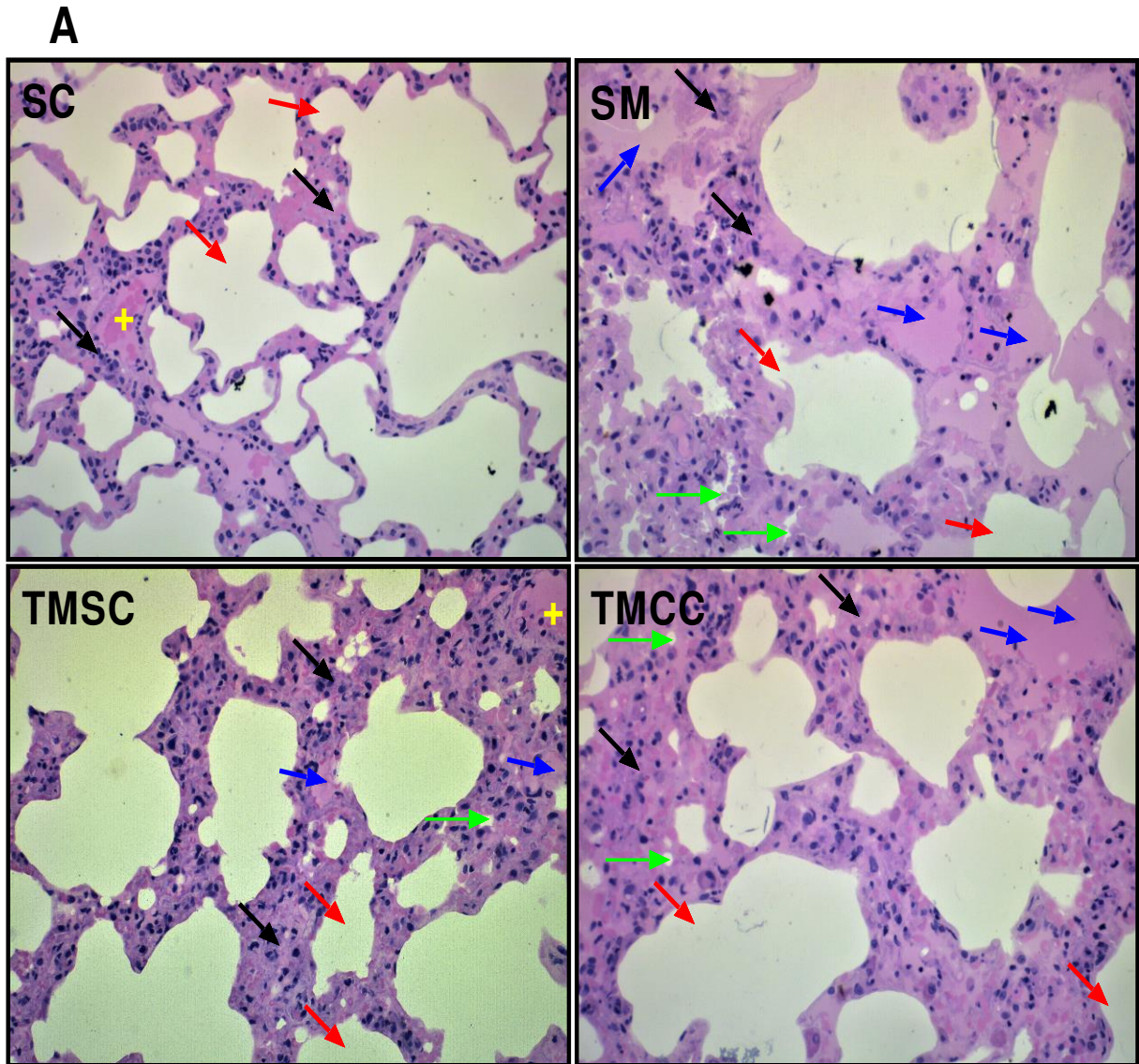
As dimensões dos cardiomiócitos do ventrículo direito estão apresentadas na figura 12. Observa-se que o comprimento celular não foi diferente ( $p > 0,05$ ) entre os grupos (Fig. 12. A). Entretanto, a aplicação de monocrotalina aumentou ( $p < 0,05$ ) a largura celular (Fig 12. B) e reduziu ( $p < 0,05$ ) a razão comprimento/largura (Fig 12.C) no grupo SM em comparação ao grupo SC. O TR prévio preveniu essas alterações somente com a continuidade (no grupo TMCC). Os valores do grupo TMSC para largura e razão comprimento/largura celular não se diferenciaram dos do grupo SM ( $p > 0,05$ ) e foram diferentes daqueles do grupo TMCC, denotando perda do efeito preventivo.



**Figura 12.** Dimensões de cardiomiócitos do ventrículo direito. (A) Comprimento; (B) Largura; (C) Razão comprimento/largura. SC, sedentário controle; SM, sedentário monocrotalina; TMSC, treinado monocrotalina sem continuidade; TMCC, treinado monocrotalina com continuidade. Valores são média  $\pm$  EPM de 10 células de 6 animais por grupo. Kruskal-wallis seguido de *post hoc* de Dunn's. Valor de  $p \leq 0,05$ . \* vs SC; # vs SM; † vs TMSC.

#### 5.4.4. Histomorfometria do pulmão direito

A figura 13 apresenta a fotomicrografia representativa do pulmão direito.



**Figura 13.** Fotomicrografia representativa do pulmão (Hematoxilina & Eosina, em corte transversal). SC, sedentário controle; SM, sedentário monocrotalina; TMSC, treinado monocrotalina sem continuidade; TMCC, treinado monocrotalina com continuidade. (Seta preta) Septo alveolar; (Seta vermelha) Alvéolo; (Cruz amarela) Vaso sanguíneo; (Seta verde) Alvéolo colapsado; (Seta azul) Alvéolo hemorrágico.

Na tabela 3, estão apresentadas as proporções histomorfométricas entre os elementos teciduais avaliados no pulmão direito. A aplicação de monocrotalina aumentou os percentuais de septo alveolar ( $p = 0,0001$ ), de alvéolo colapsado ( $p = 0,006$ ) e de alvéolo hemorrágico ( $p < 0,0001$ ), e reduziu o percentual de alvéolo pulmonar ( $p < 0,0001$ ) em comparação ao grupo SC. Todavia, o TR prévio preveniu as alterações nos percentuais de alvéolos pulmonares ( $p = 0,002$ ) e hemorrágicos ( $p < 0,0001$ ) apenas com a continuidade (no grupo TMCC). Além do mais, os valores do grupo TMSC para alvéolos hemorrágicos não se diferenciaram dos do grupo SM ( $p > 0,05$ ) e foram diferentes daqueles do grupo TMCC ( $p < 0,0001$ ). Não foram observados efeitos do TR prévio nos percentuais de septo alveolar e alvéolo colapsado ( $p > 0,05$ ). Quanto ao percentual de vaso sanguíneo, não houve efeito da monocrotalina, porém o grupo TMCC apresentou valor superior ao do grupo TMSC ( $p < 0,0001$ ).

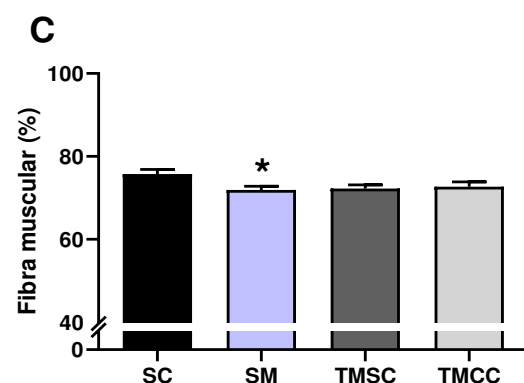
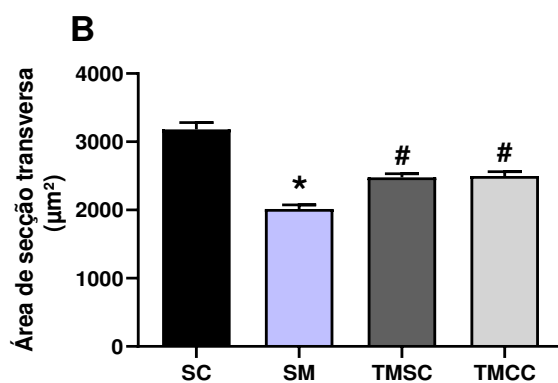
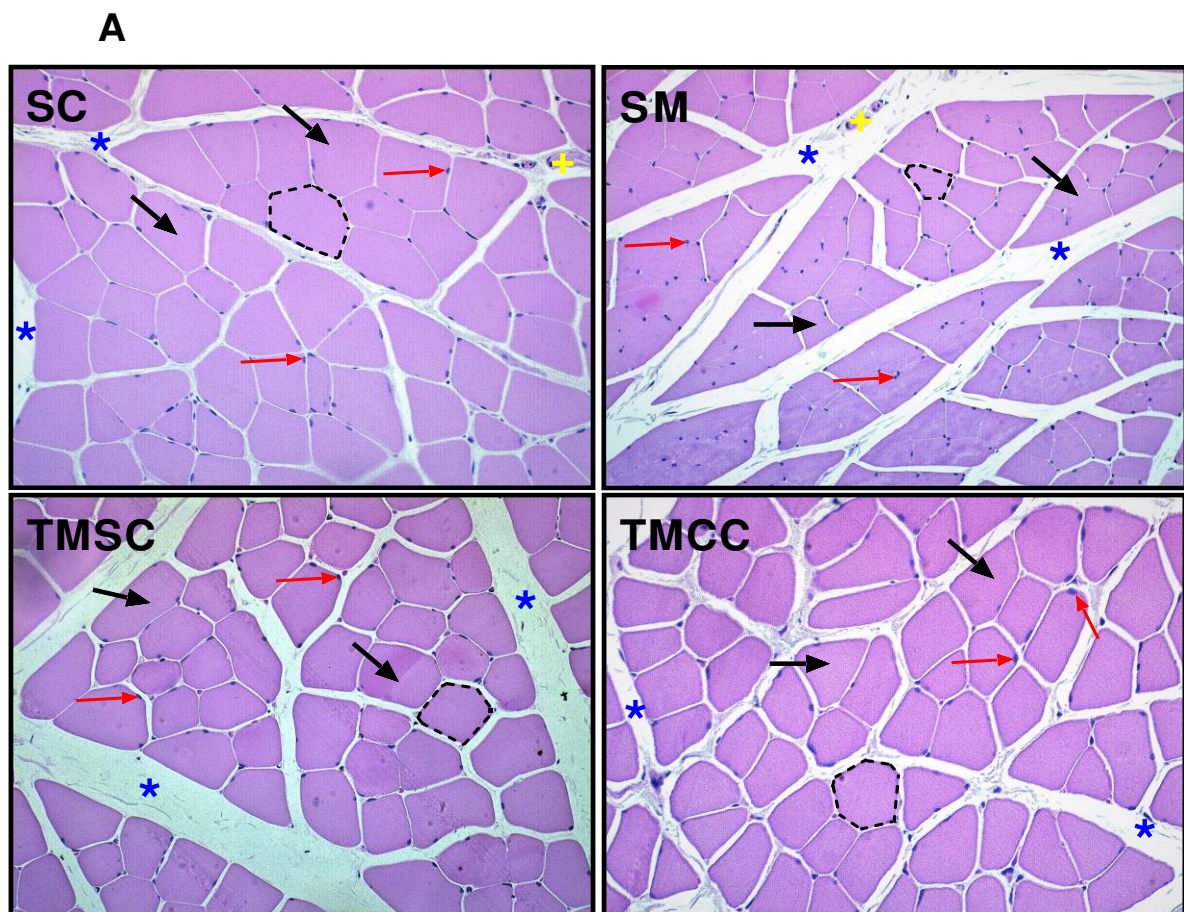
**Tabela 3.** Proporções histomorfométricas entre os elementos teciduais do pulmão.

Parâmetros	SC	SM	TMSC	TMCC
Septo alveolar (%)	44,86 ± 2,01	59,38 ± 2,90*	54,90 ± 1,81	54,63 ± 2,07
Vaso sanguíneo (%)	2,18 ± 0,19	1,84 ± 0,24	1,16 ± 0,10	2,17 ± 0,16 <sup>†</sup>
Alvéolo pulmonar (%)	52,96 ± 2,0	26,16 ± 3,47*	35,93 ± 1,82	40,95 ± 2,09 <sup>#</sup>
Alvéolo colapsado (%)	0,0 ± 0,0	1,12 ± 0,38*	2,79 ± 0,61	1,39 ± 0,39
Alvéolo hemorrágico (%)	0,0 ± 0,0	11,50 ± 1,57*	5,22 ± 0,87	0,86 ± 0,29 <sup>#†</sup>

SC, sedentário controle; SM, sedentário monocrotalina; TMSC, treinado monocrotalina sem continuidade; TMCC, treinado continuidade. Valores são média ± EPM de 10 imagens por animal em cada grupo (4-6 animais por grupo). Kruskal- wallis seguido de *post hoc* de Dunn's. Valor de  $P \leq 0,05$ . \* vs SC; # vs SM; † vs TMSC.

### 5.4.5. Histomorfometria do músculo bíceps braquial

A figura 14 apresenta os parâmetros histomorfométricos do músculo bíceps braquial. A aplicação da monocrotalina reduziu a área de secção transversa ( $p < 0,0001$  Fig 14.B) e o percentual de fibras ( $p = 0,028$ ; Fig 14. C) no grupo SM em comparação ao grupo SC. Entretanto, o TR prévio preveniu a redução apenas da secção transversa (Fig 14. C).



**Figura 14.** Histomorfometria do bíceps braquial. (A) Fotomicrografia representativa do bíceps braquial (Hematoxilina & Eosina) em corte transversal. SC, sedentário controle; SM, sedentário monocrotalina; TMSC, treinado monocrotalina sem continuidade; TMCC, treinado monocrotalina com continuidade. (Seta preta) Citoplasma; (Seta vermelha) Núcleo; (Asterisco azul) Matriz extracelular; (Cruz amarela) vaso sanguíneo. (Pontilhado preto) representação da medida da área de secção transversa da fibra muscular. (B) Área de secção transversa; Valores são média  $\pm$  EPM de 30 células por animal em cada grupo (5-6 animais por grupo). (C) Porcentagem de fibra muscular; Valores são média  $\pm$  EPM de 8-10 imagens por animal em cada grupo (5-6 animais por grupo). Anova one-way seguido de *post hoc* de Tukey (porcentagem de fibra muscular). Kruskal-wallis seguido de *post hoc* de Dunn's (área de secção transversa). Valor de  $P \leq 0,05$ . \* vs SC; # vs SM.

Os resultados das proporções histomorfométricas entre os elementos teciduais do bíceps braquial estão apresentados na tabela 4. A aplicação de monocrotalina reduziu o percentual de citoplasma ( $p = 0,031$ ) e aumentou o percentual de matriz extracelular ( $p = 0,010$ ) no grupo SM em comparação ao grupo SC. Ademais, O TR prévio não foi capaz de prevenir tais alterações ( $p > 0,05$ ). Apesar da monocrotalina não afetar os percentuais de núcleo e de vaso sanguíneo, o TR prévio aumentou o percentual de núcleo sem a continuidade (no grupo TMSC) e com a continuidade (no grupo TMCC), e também aumentou o percentual de vaso sanguíneo somente no grupo TMSC, em comparação ao grupo SM ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 4.** Proporções histomorfométricas entre os elementos teciduais do bíceps braquial.

Parâmetros	SC	SM	TMSC	TMCC
Citoplasma (%)	74,69 ± 1,09	70,97 ± 0,89*	70,57 ± 0,84	70,83 ± 1,19
Núcleo (%)	1,08 ± 0,10	0,97 ± 0,08	1,69 ± 0,15 <sup>#</sup>	1,90 ± 0,15 <sup>#</sup>
Matriz extracelular (%)	23,51 ± 1,13	27,78 ± 0,89*	27,03 ± 0,88	26,99 ± 1,16
Vaso sanguíneo (%)	0,72 ± 0,18	0,28 ± 0,10	0,71 ± 0,18 <sup>#</sup>	0,28 ± 0,08

Os dados são média ± EPM. SC, sedentário controle; SM, sedentário monocrotalina; TMSC, treinado monocrotalina sem treinado monocrotalina com continuidade. Valores são média ± EPM de 10 imagens por animal em cada grupo (5-6 animais por grupo). Anova one-way seguido de *post hoc* de Tukey (% de citoplasma e matriz extracelular). Kruskal-wallis seguido de *post hoc* de Dunn's. Valor de  $P \leq 0,05$ . \* vs SC; <sup>#</sup> vs SM; <sup>†</sup> vs TMSC.

### 5.5. Função contrátil de miócitos isolados do ventrículo direito

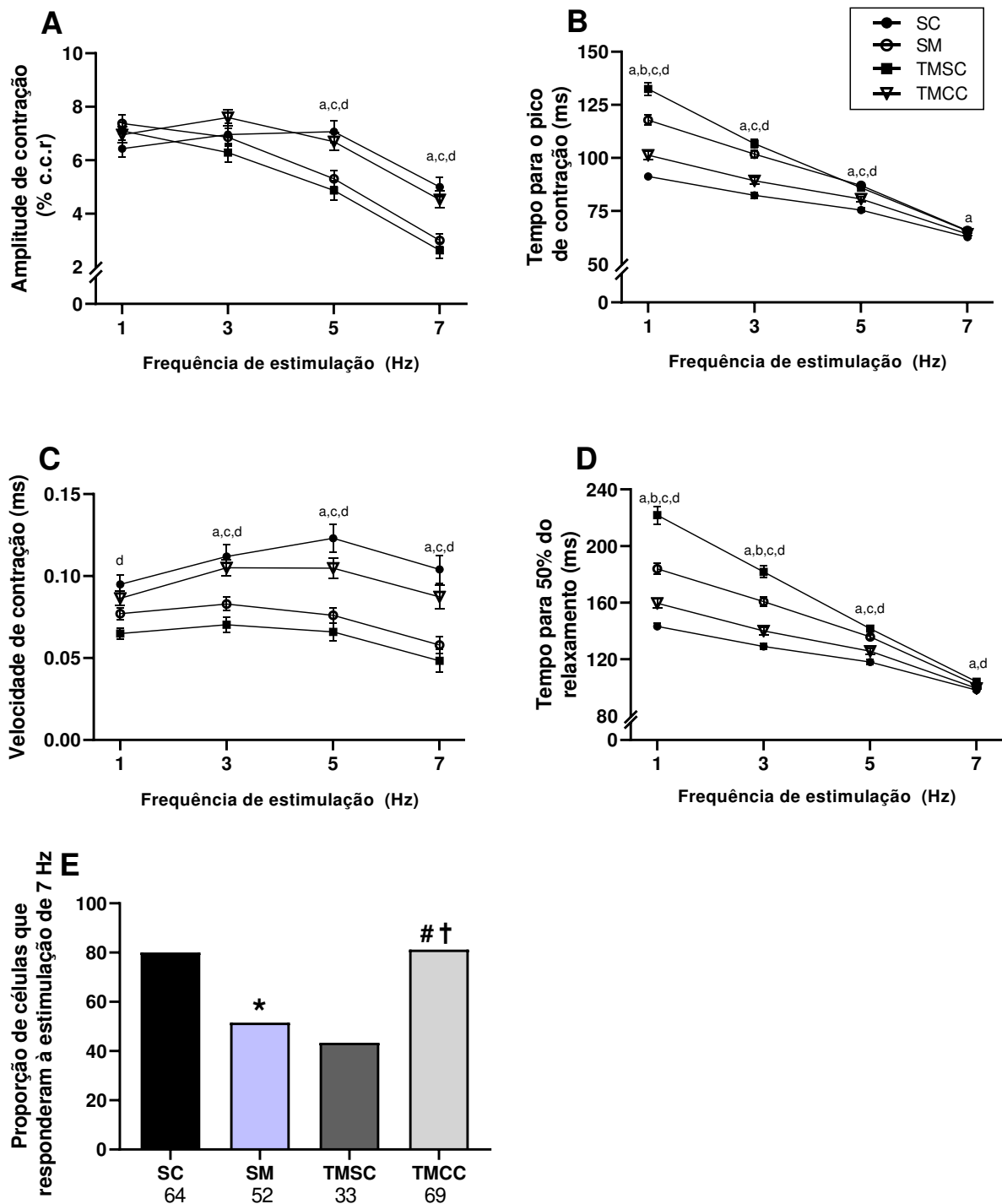
A figura 15 apresenta os resultados de contratilidade dos miócitos isolados do ventrículo direito. Nas frequências de 5 e 7 Hz, a aplicação de monocrotalina reduziu a amplitude de contração no grupo SM em comparação ao grupo SC ( $p < 0,05$ ) (Fig 15. A). Observa-se que o treinamento prévio preveniu essa redução no grupo TMCC (TMCC > SM;  $p < 0,05$ ), mas não no grupo TMSC. Além disso, o grupo TMCC teve maior amplitude de contração que o TMSC ( $p < 0,05$ ).

No que concerne ao tempo para o pico de contração (Fig 15. B), a aplicação de monocrotalina aumentou esse parâmetro no grupo SM, em comparação ao grupo SC ( $p < 0,05$ ) em todas as frequências. O TR prévio, porém, preveniu esse aumento no grupo TMCC, nas frequências de 1, 3, e 5 Hz, mas não no grupo TMSC. Além do mais, o grupo TMSC apresentou aumento desse parâmetro nas frequências de 1, 3 e 5 Hz, em comparação ao grupo TMCC, e na frequência de 1 Hz, comparado ao grupo SM.

A aplicação de monocrotalina reduziu a velocidade de contração (Fig 15. C) no grupo SM, em comparação ao grupo SC ( $p < 0,05$ ), nas frequências de 3, 5 e 7 Hz. Porém, o TR prévio preveniu tal redução no grupo TMCC, mas não no grupo TMSC. Ademais, no grupo TMSC houve redução desse parâmetro nas frequências de 3, 5 e 7 Hz, em comparação ao grupo TMCC, e na frequência de 1 Hz, quando comparado ao grupo SM.

Quanto ao tempo para 50% do relaxamento (Fig 15. D), observa-se que a aplicação de monocrotalina aumentou esse parâmetro no grupo SM, em comparação ao grupo SC ( $p < 0,05$ ), em todas as frequências. Todavia, o TR prévio preveniu esse aumento no grupo TMCC, mas não no grupo TMSC, nas frequências de 1, 3 e 5 Hz. Além do mais, no grupo TMSC, houve aumento desse parâmetro em todas as frequências, em comparação ao grupo TMCC, e nas frequências de 1 e 3 Hz, comparado ao grupo SM.

A aplicação de monocrotalina também reduziu ( $p < 0,05$ ) a proporção de células que responderam à estimulação de 7 Hz, em comparação às do grupo SC (Fig 15. E). Entretanto, o TR prévio preveniu esse prejuízo da monocrotalina no grupo TMCC, mas não no grupo TMSC. Além disso, o grupo TMCC apresentou maior porcentagem de células respondentes em comparação ao TMSC.



**Figura 15.** Contratibilidade de miócitos isolados do ventrículo direito. (A) Amplitude de contração; (B) Tempo para o pico de contração; (C) Velocidade de contração; (D) Tempo para 50% do relaxamento; (E) Proporção de células que responderam à estimulação de 7 Hz. SC, sedentário controle; SM, sedentário monocrotalina; TMSC, treinado monocrotalina sem continuidade; TMCC, treinado monocrotalina com continuidade. Valores são média  $\pm$  EPM de 12-15 células por animal em cada grupo (6-7 animais por grupo). Anova one-way com *post hoc* de Tukey para tempo para o pico de contração e para 50% do relaxamento nas frequências de 5 e 7 Hz. Kruskal-wallis com *post hoc* de Dunn's. Teste de  $\chi^2$  para proporção de células que responderam à estimulação de 7 Hz. Valor de  $p \leq 0,05$ . <sup>a</sup>SC vs SM; <sup>b</sup>SM vs TMSC; <sup>c</sup>SM vs TMCC; <sup>d</sup>TMSC vs TMCC. Teste de  $\chi^2$ , \* vs SC; # vs SM; † vs TMSC.

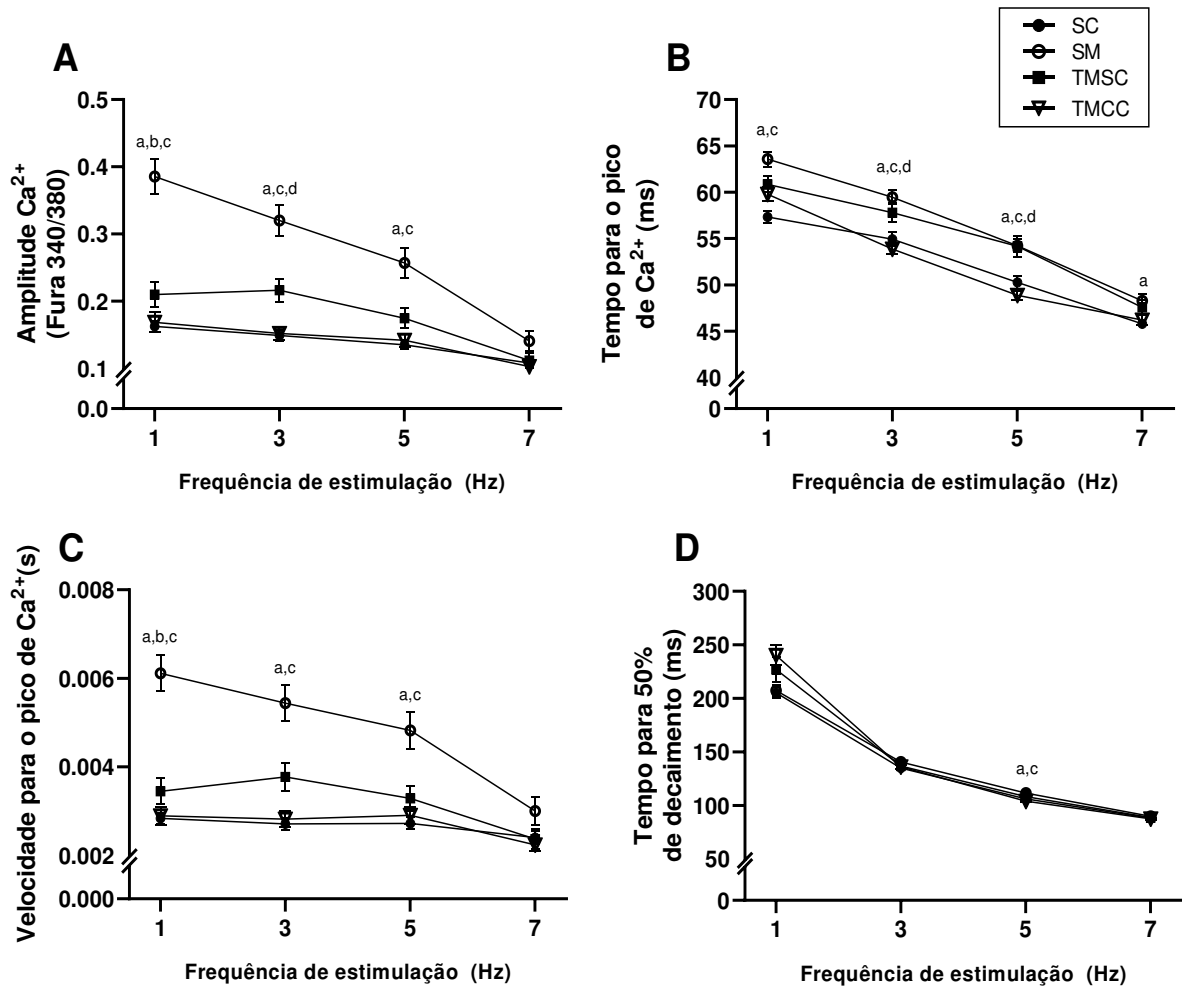
## 5.6. Cálcio intracelular transiente de miócitos isolados do ventrículo direito

A figura 16 apresenta os resultados do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente de miócitos isolados do ventrículo direito. Observa-se que a aplicação de monocrotalina aumentou a amplitude do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente no grupo SM, em comparação ao grupo SC ( $p < 0,05$ ), nas frequências de 1, 3 e 5 Hz (Fig 16. A). Porém, o TR prévio preveniu esse aumento no grupo TMCC, nas frequências de 1, 3 e 5 Hz, mas, no grupo TMSC, apenas na frequência de 1 Hz. O grupo TMSC apresentou aumento desse parâmetro na frequência de 3 Hz, em comparação ao grupo TMCC.

No que refere ao tempo para o pico do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente (Fig 16. B), nota-se que a aplicação de monocrotalina aumentou esse parâmetro no grupo SM, em comparação ao grupo SC ( $p < 0,05$ ), em todas as frequências de estimulação. Todavia, o TR prévio preveniu esse aumento no grupo TMCC, nas frequências de 1, 3 e 5 Hz, mas não no grupo TMSC. Ademais, houve aumento desse parâmetro nas frequências de 3 e 5 Hz, comparado ao grupo TMCC.

Quanto à velocidade para o pico de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente (Fig 16. C), a aplicação de monocrotalina aumentou esse parâmetro no grupo SM, em comparação ao grupo SC ( $p < 0,05$ ), nas frequências de 1, 3 e 5 Hz. Entretanto, o TR prévio preveniu esse aumento no grupo TMCC, nas frequências de 1, 3 e 5 Hz, mas não no grupo TMSC, apenas na frequência de 1 Hz.

Em relação ao tempo para 50% do decaimento (Fig 16. D), notou-se que a aplicação de monocrotalina aumentou esse parâmetro no grupo SM, em comparação ao grupo SC ( $p < 0,05$ ), apenas na frequência de 5 Hz. Porém, o TR prévio preveniu esse aumento no grupo TMCC, na frequência de 5 Hz, mas não no grupo TMSC.



**Figura 16.** Cálcio intracelular transiente de miócitos isolados do ventrículo direito. (A) Amplitude; (B) Tempo para o pico de  $Ca^{2+}$ ; (C) Velocidade para o pico de  $Ca^{2+}$  intracelular transiente (D) Tempo para 50% do decaimento. SC, sedentário controle; SM, sedentário monocrotalina; TMSC, treinado monocrotalina sem continuidade; TMCC, treinado monocrotalina com continuidade. Valores são média  $\pm$  EPM de 6-10 células por animal em cada grupo (5-7 animais por grupo). Anova one-way com *post hoc* de Tukey para 50% do relaxamento em 3 Hz. Kruskal-wallis com *post hoc* de Dunn's. Valor de  $p \leq 0,05$ . <sup>a</sup>SC vs SM; <sup>b</sup>SM vs TMSC; <sup>c</sup>SM vs TMCC; <sup>d</sup>TMSC vs TMCC.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, investigou-se se um protocolo de treinamento resistido com escalada em escada vertical realizado previamente à indução de HAP severa por MCT afetaria a força muscular, a resistência da artéria pulmonar, a função sistólica do ventrículo direito, a morfometria do ventrículo e do pulmão direitos e do bíceps braquial, a função contrátil e o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente em miócitos isolados do ventrículo direito de ratos.

### 6.1. Força muscular

Observou-se que a injeção de 60 mg/kg de MCT não reduziu significativamente a força muscular dos animais sedentários. Como os animais do grupo SM apresentaram prejuízos funcionais do VD, do pulmão direito e da artéria pulmonar, além de redução da massa muscular e da área de secção transversa do bíceps braquial, esperava-se que isso iria refletir uma redução na força muscular. Neste modelo experimental, foi demonstrado que a MCT provoca prejuízos ao músculo esquelético, tais como redução da massa muscular e da área de secção transversa do miócito [86]. Adicionalmente, o estudo de Malenfant et al. [12] demonstrou que pacientes com HAP apresentam menor força muscular do quadríceps do que indivíduos sem HAP. É concebível que os prejuízos promovidos pela MCT não tenham sido suficientes para reduzir a força muscular dos animais nesse modelo de exercício, o que indica a necessidade de mais estudos relativos ao tema.

O TR aplicado neste estudo, todavia, aumentou a força muscular dos animais tratados com MCT, o que foi mantido após a injeção. Estudos anteriores associaram o aumento da força em resposta ao TR a alterações neuromusculares e proteômicas [111, 118]. Entretanto, é importante ressaltar que o grupo TMSC apresentou força relativa menor que o grupo TMCC no dia 27 após a injeção de MCT. Além disso, a força relativa do grupo TMSC não foi diferente do grupo SM nos dias 27 e 34 após a injeção de MCT. Isso indica a perda dos efeitos preventivos, em função do destreinamento, o que foi restabelecido no dia 41 após aplicação. Como a massa e a área de secção transversa do bíceps foi semelhante nos dois grupos treinados, é provável que este resultado esteja relacionado à interrupção do processo de adaptação neural, que ocorre de forma crônica com a prática de TR e está relacionada ao ganho de força [119].

## 6.2. Resistência da artéria pulmonar

A aplicação de MCT aumentou a resistência da artéria pulmonar após 24 e 42 dias (ex. redução da TA/TE). Esse resultado confirma os de estudos anteriores, como os de Daicho et al. [67] e Novelli et al. [40], no quais se observaram níveis superiores da pressão sistólica do VD, acompanhados da redução do tempo de aceleração a partir da 2ª semana de aplicação (60 mg/kg). Assim, os dados demonstram a indução da HAP pelo protocolo utilizado.

Embora não tenham sido analisados no presente estudo, alguns mecanismos já conhecidos auxiliam na explicação desse aumento de resistência da artéria pulmonar neste modelo. Por exemplo, menor expressão de eNOS na vasculatura pulmonar, o que prejudica a vasodilatação por estímulo mecânico e resulta em maiores níveis circulantes do vasoconstritor ET-1 [26, 59]. Adicionalmente, a predominância dos elementos vasoconstritores sobre os vasodilatadores aumenta o estresse na artéria pulmonar e induz sua remodelamento adverso [26, 27, 59]. Tal remodelamento é caracterizado por aumento de colágeno, por fibrose, inflamação, apoptose, seguido de hipertrofia da camada média [38, 44]. Essas adaptações deletérias contribuem para o aumento da rigidez arterial atrelada à redução do seu lúmen, resultando em sobrecarga pressórica no VD [49]. Essas adaptações estão associadas ao remodelamento adverso do VD e, por esse motivo, a redução da resistência da artéria pulmonar e da sobrecarga ao VD é essencial para amenizar os efeitos adversos sobre o mesmo [9, 120]. Adicionalmente, a injeção de MCT resultou em remodelamento do VD, caracterizado por redução do percentual e aumento da área de secção transversa dos cardiomiócitos, além do aumento da matriz extracelular.

Por outro lado, o TR prévio foi capaz de prevenir o aumento da resistência da artéria pulmonar, sendo este efeito mais acentuado no grupo que continuou o treinamento (TMCC) do que no grupo que não continuou o treinamento após a aplicação de MCT (TMSC). Com a continuação ao TR, possivelmente houve redução das pressões sistólica e diastólica, conforme já observado em uma sessão de TR [121], o que resultou em vasodilatação e evitou remodelamento da vasculatura pulmonar. Além disso, o efeito crônico do TR em reduzir pressão arterial foi constatado em ratos espontaneamente hipertensos (SHRs), o que foi associado ao estado favorável de bradicardia e redução do estresse oxidativo cardíaco [107, 122, 123]. Todavia, no grupo que interrompeu o TR (TMSC), houve aumento da resistência da artéria pulmonar (ex. redução da TA/TE) no

dia 24, fato que pode ter ocorrido pela ausência de estímulos vasodilatadores. Embora a resistência da artéria pulmonar tenha aumentado nesse grupo no dia 24, não houve progressão para o dia 42, conforme observado no grupo SM, ressaltando, assim, o efeito preventivo proveniente do TR.

### **6.3. Função sistólica do ventrículo direito**

Neste estudo, a dosagem de MCT usada reduziu a função sistólica do VD (ex. TAPSE) 3 semanas após sua aplicação – resultado similar ao ocorrido em outro estudo [40]. Essa alteração reflete em redução do volume de ejeção e, conseqüentemente, do débito cardíaco, reduzindo o fluxo sanguíneo pulmonar e sistêmico [40, 57]. Os prejuízos sobre a função sistólica também estão associados a alterações morfométricas do VD, a exemplo da redução da quantidade de miócitos e o remodelamento de componentes da matriz extracelular, como também visto no presente trabalho, o que afeta negativamente a mecânica contrátil [64]. Nesse sentido, é provável que a redução da amplitude de contração celular (3 e 5 Hz) aqui observada tenha resultado em redução da TAPSE.

Em contrapartida, o TR prévio preveniu a redução da TAPSE, sendo mantida ao nível daquela do grupo SM, sendo de forma mais acentuada no grupo que continuou o treinamento (TMCC). Como o TR reduziu a resistência da artéria pulmonar (ex. aumento da TA/TE), entende-se que isso refletiu em menor remodelamento adverso do VD, em função da menor sobrecarga pressória e, conseqüentemente, menor prejuízo à função sistólica [9]. Ademais, o TR preveniu o aumento da área de secção transversa dos cardiomiócitos em ambos os grupos, indicando menor remodelamento cardíaco.

Todavia, foi possível observar, no final do experimento (dia 42), que o destreinamento permitiu a progressão da doença, pois o grupo que parou de treinar (TMSC) apresentou contínua diminuição dos valores da TAPSE após aplicação de MCT, mesmo tendo apresentado valores superiores aos do grupo SM. Desta forma, ressalta-se que o grupo TMSC apresentou maior resistência da artéria pulmonar e porcentagem de matriz extracelular no VD, bem como menor percentual de cardiomiócitos e amplitude de contração celular (5 e 7 Hz), em comparação ao grupo TMCC, o que explica tal resultado.

## 6.4. Morfometria do ventrículo e do pulmão direitos e do bíceps braquial

### 6.4.1. Ventrículo direito

Observou-se, no presente estudo, que a injeção de MCT aumentou as massas do coração e do VD, assim como suas respectivas razões pelo comprimento da tíbia, o que é um indicativo de hipertrofia patológica [23, 67, 124]. A hipertrofia cardíaca patológica, nesse caso, ocorre em resposta ao aumento da pós-carga atrelada à sobrecarga pressórica crônica imposta ao VD [64]. Considera-se que, nesta pesquisa, houve um aumento da sobrecarga pressórica crônica no VD, em função do aumento da resistência da artéria pulmonar, resultando em remodelamento do VD, caracterizado por aumento da área de secção transversa dos miócitos. De fato, ao analisar os miócitos isolados do VD, confirmou-se que a MCT aumentou a largura e reduziu a razão comprimento/largura dos miócitos, sem alterar o comprimento, o que foi demonstrado em estudos prévios [125, 126]. Essas alterações estão relacionadas à adição de sarcômeros em paralelo e, por conseguinte, ao aumento da área do miócito. Tal configuração caracteriza uma resposta adaptativa do VD [9] denominada hipertrofia concêntrica patológica. Esse estágio é caracterizado pela reexpressão gênica de  $\beta$ -actina e redução da razão  $\alpha/\beta$  MHC, que estão associados a prejuízos sobre a função contrátil dos sarcômeros, com possíveis alterações sobre a velocidade e a magnitude do encurtamento [60, 71, 77, 127, 128].

Adicionalmente, a aplicação de MCT reduziu os percentuais de vasos sanguíneos, núcleo, citoplasma e miócitos. O aumento da área de secção transversa do cardiomiócito poderia refletir em aumento do citoplasma, todavia, a presença de menos núcleos indica que há menos células, com uma maior área, o que resultou em redução do percentual de cardiomiócitos. É provável que a redução dos cardiomiócitos seja referente ao estado de falha cardíaca, em que há aumento do estresse oxidativo e do estado inflamatório, atrelados ao aumento de citocinas pró-inflamatórias/apoptóticas, como o TNF- $\alpha$  [68].

Além disso, foi demonstrado, em outros estudos, que 30 dias após aplicação de MCT (60 mg/kg), os animais apresentam redução da expressão do RNAm do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no VD [70], o que poderia explicar a redução dos percentuais dos vasos sanguíneos no grupo SM. Ainda, os animais apresentaram aumento da matriz extracelular que, inicialmente, ocorre como uma resposta adaptativa

para restabelecer a mecânica contrátil, mas, com o passar do tempo, torna-se deletéria [64]. Em estudo anterior, a aplicação de MCT (60 mg/kg) também resultou em aumento da matriz extracelular e do colágeno, em conjunto com a presença de fibrose no VD [42, 56]. Embora não tenha sido analisado no presente estudo, esses resultados podem ser atribuídos ao aumento da expressão proteica e do RNAm de colágeno tipo I e III demonstrado em outros estudos [53, 129], o que torna o VD mais rígido, com prejuízos à sua capacidade contrátil.

Não obstante, o TR prévio aqui utilizado preveniu a hipertrofia cardíaca induzida pela MCT, pois os grupos treinados não aumentaram as massas do coração e do VD, assim como suas respectivas razões pelo comprimento da tíbia. Nesse sentido, o TR preveniu o aumento da área de secção transversa dos cardiomiócitos, indicando menor remodelamento cardíaco. Em cardiomiócitos isolados, o TR aplicado impediu o aumento da largura e a redução da razão comprimento/largura dos cardiomiócitos somente no grupo TMCC. Acredita-se que a ausência de hipertrofia do VD nos animais do grupo TMCC tenha ocorrido em função do não aumento da resistência da artéria pulmonar observada nesses animais. Como consequência, a sobrecarga pressórica no VD não aumentou nessas datas de avaliação, sendo desnecessário o aumento da massa muscular para a manutenção de suas funções mecânicas.

No grupo TMSC, porém, a resistência da artéria pulmonar aumentou no dia 24 após a injeção de MCT, mas se manteve até o final do experimento (dia 42). Acredita-se que esse estímulo induziu hipertrofia concêntrica compensatória, mas sem progressão para a fase não-compensatória e deletéria. Dessa forma, é possível observar que o grupo TMSC apresentou aumento do percentual de matriz extracelular, provavelmente de forma adaptativa, pois não prejudicou a TAPSE. Somado a isso, a redução do seu percentual de cardiomiócitos ocorreu pela redução do citoplasma, provavelmente por causa da menor área de secção transversa, ao passo que o TR preveniu a redução do percentual de núcleos. De fato, na fase compensatória, não há apoptose celular, o que explica a ausência de redução de núcleos, além do aumento de vasos sanguíneos, indicando angiogênese fisiológica, também característica dessa fase [64].

#### **6.4.2. Pulmão direito**

A injeção de MCT aumentou a massa do pulmão direito e as suas respectivas razões. Tal efeito foi demonstrado em outros estudos [77, 78]. O remodelamento da

vasculatura pulmonar está relacionado a alterações prejudiciais, como a redução da conformidade dinâmica e do volume corrente, atrelada ao aumento da frequência respiratória e da parede/do septo alveolar [80, 81].

Nessa perspectiva, no presente estudo, a injeção de MCT aumentou o septo alveolar, com redução concomitante da porcentagem dos alvéolos pulmonares. Tais alterações estão associadas ao aumento da inflamação e do estresse oxidativo, característicos nesse modelo experimental [25, 54, 58, 130]. Nesse sentido, a intervenção com a utilização de anti-inflamatório (anti-TNF $\alpha$ ) foi capaz de reduzir as células inflamatórias presentes ao redor dos brônquios e bronquíolos, a inflamação e a espessura do septo alveolar, reforçando a participação direta da inflamação sobre o processo de seu remodelamento [131]. Com base nisso, acredita-se que o aumento da espessura do septo alveolar induz, de forma concomitante, à redução da área dos alvéolos pulmonares, conforme demonstrado em estudo anterior [79]. Ademais, observou-se que os animais tratados com MCT apresentaram colapsos e hemorragias nos alvéolos.

É pertinente pontuar que essa hemorragia alveolar possui causa multifatorial, dentre elas o aumento da inflamação tecidual [82, 83]. Como nos alvéolos pulmonares ocorre o processo de hematose, ressalta-se que as alterações supracitadas (diminuição dos alvéolos comuns e aumento de alvéolos colapsados e hemorrágicos) trazem prejuízos relacionados à troca gasosa (CO $_2$  e O $_2$ ) e contribuem com os sintomas de dispneia [132, 133].

Em relação ao TR prévio, notou-se que esse reduziu a massa do pulmão direito e sua respectiva razão pelo comprimento da tíbia no grupo TMCC. Além disso, o TR aumentou a porcentagem de alvéolos pulmonares e reduziu a porcentagem de alvéolos hemorrágicos. Os mecanismos que explicam a preservação dos alvéolos pulmonares pelo TR ainda não estão bem esclarecidos. Entretanto, sabe-se que esse resultado está associado a benefícios sobre a hematose, que são traduzidos em aumento da troca e difusão gasosa e da biodisponibilidade de O $_2$  [134]. Isso é importante nesse modelo experimental e em humanos, uma vez que a dispneia é um dos sintomas agravantes apresentados pelos pacientes com HAP.

#### **6.4.3. Bíceps braquial**

A injeção de MCT reduziu a massa do bíceps braquial e sua respectiva razão

pelo comprimento da tíbia. De acordo com Moreira-Golçalves et al. [84], nesse modelo, a redução da massa e da área de secção transversa do gastrocnêmio estão associadas ao desequilíbrio entre o anabolismo e o catabolismo, explicado pelo aumento dos níveis séricos de marcadores catabólicos, como IL-1 $\beta$ , da CRP e da miostatina; assim como pelo aumento da razão MAFbx/atrogina-1, atrelado ao aumento da atividade proteolítica. Embora no estudo citado [84] não tenha havido alterações da Akt/mTOR, uma via intimamente relacionada com a sinalização anabólica.

A monocrotalina reduziu também a porcentagem e a área de secção transversa das fibras musculares do bíceps. Foi demonstrado que, na falha cardíaca induzida por MCT, ocorre aumento dos níveis circulantes de TNF- $\alpha$  de forma paralela ao de esfingosina – um segundo mensageiro capaz de induzir diretamente apoptose e degradação do tecido muscular esquelético [85]. Nessa perspectiva, possivelmente, a redução da massa do bíceps braquial é atribuída à redução da área de secção transversa e da porcentagem de fibra muscular no tecido, embora possa haver manutenção da massa muscular esquelética com redução da área de secção transversa [135]. Além disso, é possível que o aumento da matriz extracelular tenha promovido redução do percentual de citoplasma e de fibra muscular, uma vez que houve manutenção dos núcleos.

Por outro lado, o TR prévio impediu a redução da massa muscular e da área de secção transversa do bíceps braquial. Sabe-se que o TR induz hipertrofia da musculatura esquelética, por meio de sinalizações moleculares e ativação de células satélites. Adicionalmente, o TR aumenta a expressão das proteínas PI3k, Akt, mTOR e p70S6K em atletas, as quais participam diretamente na síntese proteica [136] em associação ao aumento da ativação das células satélites [137, 138].

No modelo de exercício usado no presente estudo, Padilha et al. [111] demonstraram que houve hipertrofia dos músculos flexor longo do hálux e plantar, o que foi acompanhado do aumento entre a razão P-70S6K/p-P-70S6K. Adicionalmente, Tibana et al. [118] demonstraram que este modelo de TR causou hipertrofia do músculo gastrocnêmio de ratos normotensos. É concebível que a hipertrofia do músculo bíceps braquial observada nos grupos TMSC e TMCC deve-se a sinalizações inter e extracelulares mediadas pelas células satélites [137, 138].

O TR prévio aumentou a porcentagem de núcleos, o que sugere maior presença de miócitos por área, refletindo em níveis inferiores de apoptose tecidual. Entretanto, não foi capaz de atenuar o aumento da matriz extracelular após a aplicação de MCT. O

TR pode aumentar a quantidade de colágeno no músculo esquelético [139]. Em ratos jovens e idosos, o TR, durante 12 semanas, reduziu o tecido conjuntivo nos músculos sóleo e gastrocnêmio e, paradoxalmente, aumentou a expressão dos RNAs mensageiros de COL-1A1 e COL-3A1 no gastrocnêmio [140]. Nesse mesmo estudo [140], os ratos idosos treinados apresentaram expressão aumentada dos RNAs mensageiros das MMPs do tipo 2 (MMP-2) e tipo 9 (MMP-9), os quais estão intimamente relacionados ao remodelamento da matriz extracelular, além da redução do fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ), o qual estimula os fibroblastos a induzir fibrose tecidual.

### **6.5. Função contrátil e cálcio intracelular transiente de miócitos isolados do ventrículo direito**

No presente estudo, demonstrou-se que a injeção de MCT reduziu a amplitude de contração (3 e 5 Hz), mas aumentou a amplitude do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente (1, 3 e 5 Hz). Embora, em alguns estudos, a redução da amplitude de contração tenha sido associada à redução da amplitude de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente, ratos injetados com 60 mg/kg de MCT podem apresentar níveis superiores de amplitude de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente tanto na fase adaptativa quanto na não-adaptativa [72]. O estudo de Sabourin et al. [73] demonstrou que ratos com falha cardíaca induzida por MCT tiveram aumento da amplitude do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente, atrelada ao aumento da carga de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, entretanto, acompanhado do aumento da amplitude de contração, o que não ocorreu em nosso estudo. Por outro lado, Benoist et al. [74] reportaram que animais injetados com MCT apresentaram maior duração do potencial de ação, que refletiu em aumento da carga, da liberação fracionária e do vazamento de  $\text{Ca}^{2+}$ , aumentando a amplitude de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente, porém com redução da amplitude de contração. Isso é um indicativo de redução da sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$ . De fato, em cardiomiócitos do VD de humanos com HAP, constatou-se menor sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$ , e, por conta disso, níveis elevados do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente não aumentam a amplitude de contração [141].

Em relação ao tempo de contração, a aplicação de MCT (grupo SM) aumentou o tempo para o pico de contração, em todas as frequências, o que por sua vez, está atrelado ao aumento do tempo para o pico do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente em comparação ao grupo SC. Esse resultado pode ser atribuído ao atraso da liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  para o

sarcoplasma, por meio dos receptores RyR2. Em vista disso, Pacagnelli et al. [114] demonstraram que animais tratados com MCT (60mg/kg) apresentaram redução do RNAm de RyR2, o que indica redução da sua expressão. Nesse sentido, é provável que os prejuízos sobre a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  do RS tenham reduzido a velocidade de contração (amplitude / tempo para o pico de contração), conforme apresentado pelos animais do grupo SM. Assim, esses prejuízos na função contrátil dos cardiomiócitos ajudam a explicar a redução da função do VD nesse modelo experimental, observada pela avaliação da TAPSE. Por outro lado, a velocidade para o pico de  $\text{Ca}^{2+}$  (amplitude / tempo para o pico de  $\text{Ca}^{2+}$ ) foi maior nos animais do grupo SM, possivelmente, pelo valor superior da amplitude do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente apresentado por esses animais.

Ademais, foi possível observar que a injeção de MCT prolongou o tempo para 50% de relaxamento (1, 3, 5 e 7 Hz) e de 50% do decaimento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente (5 Hz) dos cardiomiócitos. Tal prolongamento está relacionado a menor expressão e atividade SERCA2a, que é fosforilada pela PLB [142]. Apesar dessas proteínas não terem sido avaliadas no presente estudo, essa alteração já foi observada nesse modelo experimental [23, 114].

Por outro lado, o TR aplicado preveniu tanto a redução da amplitude de contração (5 e 7 Hz) quanto o aumento da amplitude de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente (1, 3 e 5 Hz). Esse resultado reflete o aumento da sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  dos miócitos do VD, além da preservação da função do VD.

Além disso, o TR aplicado preveniu que os cardiomiócitos tivessem os tempos para o pico de contração e de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente (1, 3 e 5 Hz) prolongados. Resultados similares foram apresentados em estudo prévio [143] em animais saudáveis, em que o TR, durante 8 semanas, reduziu o tempo para o pico de contração, associado à redução do microRNA (miRNA) 214 (MiRNA-214), que promove inibição transcricional para formação da SERCA2a, resultando em aumento da sua expressão. De fato, ao reduzir o tempo de relaxamento celular ocorre, concomitantemente, a redução do tempo para a contração [143].

Somado a isso, o grupo TMCC apresentou velocidade de contração superior em relação ao grupo SM, nas frequências de 3, 5 e 7 Hz, indicando o efeito protetivo do TR. Apesar disso, a velocidade até o pico de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente foi menor no grupo TMCC que no grupo SM (1, 3 e 5 Hz), possivelmente por apresentar menor amplitude de  $\text{Ca}^{2+}$ . Adicionalmente, o TR prévio impediu que os cardiomiócitos do grupo TMCC tivessem os tempos para 50% de relaxamento da contração (1, 3 e 5 Hz) e de

decaimento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente (5 Hz) prolongados. Esse resultado pode ser atribuído ao efeito do TR em aumentar a recaptação do  $\text{Ca}^{2+}$  para o RS, por meio da SERCA2a, conforme demonstrado no VE de animais normotensos [143, 144]. De fato, isso evidencia o efeito do TR em aumentar a recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS, possibilitando que o relaxamento celular seja mais rápido.

A eficácia do efeito protetivo do TR também se manifesta na quantidade de células respondentes à estimulação na frequência de 7 Hz do grupo TMCC, que foi superior às do grupo SM. Isso indica que o TR realizado previamente e continuado após a injeção de MCT (grupo TMCC) promove adaptações celulares e moleculares que previnem o efeito deletério da doença. Tais adaptações fazem com que os cardiomiócitos tenham capacidade de responder a altas demandas funcionais, aqui simuladas pela frequência de estimulação.

Entretanto, verificou-se que alguns efeitos protetivos do TR prévio, em nível celular, foram perdidos ao longo do tempo, após a aplicação de MCT no grupo TMSC, que descontinuou o treinamento. Em função do destreinamento desses animais, propriedades como amplitude de contração e de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transiente (3 e 5 Hz), velocidade de contração, tempos para o pico de contração e para 50% de relaxamento e a quantidade de células respondentes à 7 Hz do grupo TMSC foram similares aos apresentados pelo grupo SM. Observa-se que 4 semanas de destreinamento em animais espontaneamente hipertensos foram acompanhadas da reversão das adaptações nas expressões de SERCA2a e da PLB fosforilada na serina 16 (PLBser16) [145] ao treinamento com exercício aeróbio.

Vale ressaltar que, em alguns parâmetros avaliados, tais como o tempo para o pico, a velocidade de contração (1 Hz) e o tempo para 50% de relaxamento (1 e 3 Hz), o grupo TMSC apresentou resultados piores que os do grupo SM. Esses resultados ressaltam os efeitos do destreinamento.

## 7. CONCLUSÕES

O TR aplicado previamente aumenta a força muscular e previne a disfunção sistólica e a hipertrofia patológica do ventrículo direito em ratos com HAP severa induzida por MCT. Ainda, o TR prévio previne o aumento da resistência da artéria pulmonar e a atrofia muscular esquelética. Todavia, os efeitos preventivos sobre o remodelamento adverso do pulmão direito, o aumento das dimensões celulares e as disfunções da contração e do cálcio intracelular transiente em miócitos isolados do ventrículo direito foram observados somente nos animais que realizaram o TR prévio e continuaram o exercício após a indução da HAP. Esses resultados sugerem que o TR prévio previne, parcialmente, os efeitos deletérios provocados pela HAP severa, contudo, a manutenção dos efeitos de proteção cardiopulmonar depende da continuidade da prática do exercício.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Kovacs, G., et al., *Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review*. **Eur Respir J**, 2009. 34(4): p. 888-94.
2. Simonneau, G., et al., *Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension*. **Eur Respir J**, 2019. 53(1).
3. Li, Z., et al., *Pulmonary hypertension as an independent predictor of cardiovascular mortality and events in hemodialysis patients*. **Int Urol Nephrol**, 2014. 46(1): p. 141-9.
4. Tang, M., et al., *Pulmonary Hypertension, Mortality, and Cardiovascular Disease in CKD and ESRD Patients: A Systematic Review and Meta-analysis*. **Am J Kidney Dis**, 2018. 72(1): p. 75-83.
5. Mehari, A., O. Valle, and R.F. Gillum, *Trends in pulmonary hypertension mortality and morbidity*. **Pulm Med**, 2014. 2014: p. 105864.
6. 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)*. **Eur Heart J**, 2016. 37(1): p. 67-119.
7. Lau, E.M.T., et al., *Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension*. **Nat Rev Cardiol**, 2017. 14(10): p. 603-614.
8. Vonk-Noordegraaf, A., et al., *Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology*. **J Am Coll Cardiol**, 2013. 62(25 Suppl): p. D22-33.
9. Ryan, J.J., et al., *Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension*. **Can J Cardiol**, 2015. 31(4): p. 391-406.
10. Panagiotou, M., A.J. Peacock, and M.K. Johnson, *Respiratory and limb muscle dysfunction in pulmonary arterial hypertension: a role for exercise training?* **Pulm Circ**, 2015. 5(3): p. 424-34.
11. Riou, M., et al., *Skeletal and Respiratory Muscle Dysfunctions in Pulmonary Arterial Hypertension*. **Journal of clinical medicine**, 2020. 9(2): p. 410.
12. Malenfant, S., et al., *Impaired Skeletal Muscle Oxygenation and Exercise Tolerance in Pulmonary Hypertension*. **Med Sci Sports Exerc**, 2015. 47(11): p. 2273-82.

13. Keusch, S., et al., *Rehabilitation in patients with pulmonary arterial hypertension*. **Swiss Med Wkly**, 2017. 147: p. w14462.
14. Sakao, S., *Chronic obstructive pulmonary disease and the early stage of cor pulmonale: A perspective in treatment with pulmonary arterial hypertension-approved drugs*. **Respir Investig**, 2019. 57(4): p. 325-329.
15. Sztuka, K. and M. Jasińska-Stroschein, *Animal models of pulmonary arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis of data from 6126 animals*. **Pharmacol Res**, 2017. 125(Pt B): p. 201-214.
16. Kay, J.M., P. Harris, and D. Heath, *Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds*. **Thorax**, 1967. 22(2): p. 176-9.
17. Gomez-Arroyo, J.G., et al., *The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective*. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 2012. 302(4): p. L363-9.
18. Reid, M.J., et al., *Involvement of cytochrome P450 3A in the metabolism and covalent binding of <sup>14</sup>C-monocrotaline in rat liver microsomes*. **J Biochem Mol Toxicol**, 1998. 12(3): p. 157-66.
19. Wilson, D.W., et al., *Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity*. **Crit Rev Toxicol**, 1992. 22(5-6): p. 307-25.
20. Kasahara, Y., et al., *Bioactivation of monocrotaline by P-450 3A in rat liver*. **J Cardiovasc Pharmacol**, 1997. 30(1): p. 124-9.
21. Handoko, M.L., et al., *Opposite effects of training in rats with stable and progressive pulmonary hypertension*. **Circulation**, 2009. 120(1): p. 42-9.
22. Pei, Y., et al., *Rosuvastatin attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension via regulation of Akt/eNOS signaling and asymmetric dimethylarginine metabolism*. **European Journal of Pharmacology**, 2011. 666(1): p. 165-172.
23. Alencar, A.K.N., et al., *N-acylhydrazone derivative ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension through the modulation of adenosine AA2R activity*. **International Journal of Cardiology**, 2014. 173(2): p. 154-162.
24. Li, H., et al., *Telmisartan attenuates monocrotaline-induced pulmonary artery endothelial dysfunction through a PPAR gamma-dependent PI3K/Akt/eNOS pathway*. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, 2014. 28(1): p. 17-24.
25. 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*. **European Journal of Pharmacology**, 2014. 740: p. 379-387.
26. Nassar, S.Z., et al., *Cardioprotective effect of cerium oxide nanoparticles in*

- monocrotaline rat model of pulmonary hypertension: A possible implication of endothelin-1. Life Sciences*, 2018. 201: p. 89-101.
27. Zambelli, V., et al., *Efficacy of aminaftone in a rat model of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. European Journal of Pharmacology*, 2011. 667(1): p. 287-291.
  28. Kim, J.A., et al., *Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. Circulation*, 2006. 113(15): p. 1888-904.
  29. Zheng, Z., et al., *Chlorogenic acid suppresses monocrotaline-induced sinusoidal obstruction syndrome: The potential contribution of NFκB, Egr1, Nrf2, MAPKs and PI3K signals. Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2016. 46: p. 80-89.
  30. Nagata, T., et al., *Thromboxane inhibition and monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. Respirology*, 1997. 2(4): p. 283-9.
  31. Liu, C.-P., et al., *Endothelial nitric oxide synthase-enhancing G-protein coupled receptor antagonist inhibits pulmonary artery hypertension by endothelin-1-dependent and endothelin-1-independent pathways in a monocrotaline model. The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 2014. 30(6): p. 267-278.
  32. Czer, G.T., et al., *Low-dose PGI2 prevents monocrotaline-induced thromboxane production and lung injury. J Appl Physiol (1985)*, 1986. 60(2): p. 464-71.
  33. Kataoka, M., et al., *A long-acting prostacyclin agonist with thromboxane inhibitory activity for pulmonary hypertension. Am J Respir Crit Care Med*, 2005. 172(12): p. 1575-80.
  34. Kaufmann, P., et al., *Coronary artery dimensions in primary and secondary left ventricular hypertrophy. Journal of the American College of Cardiology*, 1996. 28(3): p. 745-750.
  35. Pietra, G.G., et al., *Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. Journal of the American College of Cardiology*, 2004. 43(12, Supplement): p. S25-S32.
  36. Park, B.M., et al., *Fermented garlic extract ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. Journal of Functional Foods*, 2017. 30: p. 247-253.
  37. Molteni, A., et al., *Effect of the antioxidant α-tocopherol in an experimental model of pulmonary hypertension and fibrosis: Administration of monocrotaline. Nutrition Research*, 2004. 24(9): p. 707-720.
  38. Wang, Q., et al., *Monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension is*

- attenuated by TNF- $\alpha$  antagonists via the suppression of TNF- $\alpha$  expression and NF- $\kappa$ B pathway in rats. **Vascular Pharmacology**, 2013. 58(1): p. 71-77.*
39. Zhang, M., et al., *Protective effects of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid on pulmonary arterial hypertension via regulation of Rho A/Rho kinase pathway. **Chemico-Biological Interactions**, 2019. 311: p. 108749.*
  40. 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. **European Journal of Pharmacology**, 2019. 865: p. 172777.*
  41. Nishida, M., et al., *Role of endothelin ETB receptor in the pathogenesis of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **European Journal of Pharmacology**, 2004. 496(1): p. 159-165.*
  42. Shi, R., et al., *Baicalein attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by inhibiting vascular remodeling in rats. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, 2018. 48: p. 124-135.*
  43. Xu, Y., et al., *Stox1 induced the proliferation and cell cycle arrest in pulmonary artery smooth muscle cells via AKT signaling pathway. **Vascular Pharmacology**, 2019. 120: p. 106568.*
  44. Zhang, M., et al., *Programmed death-ligand 1 triggers PASMCs pyroptosis and pulmonary vascular fibrosis in pulmonary hypertension. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 2020. 138: p. 23-33.*
  45. Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy, *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res**, 2006. 69(3): p. 562-73.*
  46. Zhu, N., et al., *Thymoquinone attenuates monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension via inhibiting pulmonary arterial remodeling in rats. **International Journal of Cardiology**, 2016. 221: p. 587-596.*
  47. Li, X.Q., et al., *Fluoxetine inhibited extracellular matrix of pulmonary artery and inflammation of lungs in monocrotaline-treated rats. **Acta Pharmacol Sin**, 2011. 32(2): p. 217-22.*
  48. Gan, J., et al., *Rosuvastatin suppresses platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration via the MAPK signaling pathway. **Exp Ther Med**, 2013. 6(4): p. 899-903.*
  49. Leong, Z.P. and Y. Hikasa, *Effects of masitinib compared with tadalafil for the treatment of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. **Vascul Pharmacol**, 2019. 122-123: p. 106599.*
  50. Chen, R., et al., *Docosahexaenoic acid inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension via attenuating endoplasmic reticulum stress and inflammation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 2018. 314(2): p. L243-*

- l255.
51. Tawa, M., et al., *Stimulation of nitric oxide-sensitive soluble guanylate cyclase in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats.* **Life Sci**, 2018. 203: p. 203-209.
  52. Cao, Y.Y., et al., *Regulatory effects of Prohibitin 1 on proliferation and apoptosis of pulmonary arterial smooth muscle cells in monocrotaline-induced PAH rats.* **Life Sci**, 2020. 250: p. 117548.
  53. Liu, Z., et al., *Effect of estrogen on right ventricular remodeling of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats and its mechanism.* **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 2019. 23(4): p. 1742-1750.
  54. Wu, F., et al., *Protective effects of aloperine on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats.* **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 2017. 89: p. 632-641.
  55. Hu, Y., et al., *AOS ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension by restraining the activation of P-selectin/p38MAPK/NF- $\kappa$ B pathway in rats.* **Biomed Pharmacother**, 2019. 109: p. 1319-1326.
  56. Okada, M., et al., *Effects of Telmisartan on Right Ventricular Remodeling Induced by Monocrotaline in Rats.* **Journal of Pharmacological Sciences**, 2009. 111(2): p. 193-200.
  57. Enache, I., et al., *Downhill exercise training in monocrotaline-injected rats: Effects on echocardiographic and haemodynamic variables and survival.* **Arch Cardiovasc Dis**, 2017. 110(2): p. 106-115.
  58. Türck, P., et al., *Trapidil improves hemodynamic, echocardiographic and redox state parameters of right ventricle in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension model.* **Biomed Pharmacother**, 2018. 103: p. 182-190.
  59. Ahmed, L.A., et al., *Naringenin adds to the protective effect of L-arginine in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats: favorable modulation of oxidative stress, inflammation and nitric oxide.* **Eur J Pharm Sci**, 2014. 62: p. 161-70.
  60. Kolli, M.B., et al., *Cerium oxide nanoparticles attenuate monocrotaline induced right ventricular hypertrophy following pulmonary arterial hypertension.* **Biomaterials**, 2014. 35(37): p. 9951-9962.
  61. Paffett, M.L., S.N. Lucas, and M.J. Campen, *Resveratrol reverses monocrotaline-induced pulmonary vascular and cardiac dysfunction: a potential role for atrogin-1 in smooth muscle.* **Vascul Pharmacol**, 2012. 56(1-2): p. 64-73.
  62. Lima-Seolin, B.G., et al., *Bucindolol improves right ventricle function in rats with pulmonary arterial hypertension through the reversal of autonomic imbalance.* **Eur J Pharmacol**, 2017. 798: p. 57-65.

63. Fontoura, D., et al., *Myocardial and anti-inflammatory effects of chronic bosentan therapy in monocrotaline-induced pulmonary hypertension*. **Rev Port Cardiol**, 2014. 33(4): p. 213-22.
64. Bernardo, B.C., et al., *Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies*. **Pharmacol Ther**, 2010. 128(1): p. 191-227.
65. Alencar, A.K., et al., *Activation of GPER ameliorates experimental pulmonary hypertension in male rats*. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 2017. 97: p. 208-217.
66. Perros, F., et al., *Nebivolol for improving endothelial dysfunction, pulmonary vascular remodeling, and right heart function in pulmonary hypertension*. **J Am Coll Cardiol**, 2015. 65(7): p. 668-80.
67. Daicho, T., et al., *Possible involvement of mitochondrial energy-producing ability in the development of right ventricular failure in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats*. **J Pharmacol Sci**, 2009. 111(1): p. 33-43.
68. Li, Y., et al., *Osthole attenuates right ventricular remodeling via decreased myocardial apoptosis and inflammation in monocrotaline-induced rats*. **Eur J Pharmacol**, 2018. 818: p. 525-533.
69. Wisutthathum, S., et al., *Eulophia macrobulbon extract relaxes rat isolated pulmonary artery and protects against monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension*. **Phytomedicine**, 2018. 50: p. 157-165.
70. Partovian, C., et al., *Heart and lung VEGF mRNA expression in rats with monocrotaline- or hypoxia-induced pulmonary hypertension*. **Am J Physiol**, 1998. 275(6): p. H1948-56.
71. Vescovo, G., et al., *Contractile abnormalities of single right ventricular myocytes isolated from rats with right ventricular hypertrophy*. **J Mol Cell Cardiol**, 1989. 21 Suppl 5: p. 103-11.
72. Antigny, F., et al., *Excitation-contraction coupling and relaxation alteration in right ventricular remodelling caused by pulmonary arterial hypertension*. **Archives of Cardiovascular Diseases**, 2020. 113(1): p. 70-84.
73. Sabourin, J., et al., *Ca<sup>2+</sup> handling remodeling and STIM1L/Orai1/TRPC1/TRPC4 upregulation in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy*. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 2018. 118: p. 208-224.
74. Benoist, D., et al., *Cardiac arrhythmia mechanisms in rats with heart failure induced by pulmonary hypertension*. *American journal of physiology*. **Heart and circulatory physiology**, 2012. 302(11): p. H2381-H2395.
75. Pacagnelli, F.L., et al., *Preventive aerobic training exerts a cardioprotective*

- effect on rats treated with monocrotaline. Int J Exp Pathol*, 2016. 97(3): p. 238-47.
76. Xie, Y.P., et al., *Sildenafil prevents and reverses transverse-tubule remodeling and Ca(2+) handling dysfunction in right ventricle failure induced by pulmonary artery hypertension. Hypertension*, 2012. 59(2): p. 355-62.
  77. Nogueira-Ferreira, R., et al., *Exercise preconditioning prevents MCT-induced right ventricle remodeling through the regulation of TNF superfamily cytokines. Int J Cardiol*, 2016. 203: p. 858-66.
  78. Colombo, R., et al., *Effects of exercise on monocrotaline-induced changes in right heart function and pulmonary artery remodeling in rats. Can J Physiol Pharmacol*, 2013. 91(1): p. 38-44.
  79. Suzuki, T., et al., *Mesenchymal stem/stromal cells stably transduced with an inhibitor of CC chemokine ligand 2 ameliorate bronchopulmonary dysplasia and pulmonary hypertension. Cytotherapy*, 2020. 22(4): p. 180-192.
  80. Lai, Y.L., J.W. Olson, and M.N. Gillespie, *Ventilatory dysfunction precedes pulmonary vascular changes in monocrotaline-treated rats. J Appl Physiol (1985)*, 1991. 70(2): p. 561-6.
  81. Zhou, K.R. and Y.L. Lai, *alpha-Difluoromethylornithine attenuates monocrotaline-induced airway/lung dysfunction. J Appl Physiol (1985)*, 1992. 72(5): p. 1914-21.
  82. Horiguchi, M., et al., *Pulmonary administration of integrin-nanoparticles regenerates collapsed alveoli. J Control Release*, 2014. 187: p. 167-74.
  83. Borges, E.d.R., A.M. Ab'Saber, and C.S.V. Barbas, *Síndromes hemorrágicas pulmonares %J Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2005. 31: p. s36-s43.
  84. Moreira-Gonçalves, D., et al., *Signaling pathways underlying skeletal muscle wasting in experimental pulmonary arterial hypertension. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2015. 1852(12): p. 2722-2731.
  85. Dalla Libera, L., et al., *Apoptosis in the Skeletal Muscle of Rats with Heart Failure is Associated with Increased Serum Levels of TNF- $\alpha$  and Sphingosine. Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2001. 33(10): p. 1871-1878.
  86. Moreira-Gonçalves, D., et al., *Cardioprotective effects of early and late aerobic exercise training in experimental pulmonary arterial hypertension. Basic Res Cardiol*, 2015. 110(6): p. 57.
  87. Fujita, N., et al., *Time course of ubiquitin-proteasome and macroautophagy-lysosome pathways in skeletal muscle in rats with heart failure. Biomed Res*, 2015. 36(6): p. 383-92.

88. Hoeper, M.M., et al., *Initial combination therapy with ambrisentan and tadalafil and mortality in patients with pulmonary arterial hypertension: a secondary analysis of the results from the randomised, controlled AMBITION study.* **Lancet Respir Med**, 2016. 4(11): p. 894-901.
89. Benza, R.L., et al., *An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the REVEAL Registry.* **Chest**, 2012. 142(2): p. 448-456.
90. Klinger, J.R., et al., *Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension in Adults: Update of the CHEST Guideline and Expert Panel Report.* **Chest**, 2019. 155(3): p. 565-586.
91. Galiè, N., et al., *Comparison of hemodynamic parameters in treatment-naïve and pre-treated patients with pulmonary arterial hypertension in the randomized phase III PATENT-1 study.* **J Heart Lung Transplant**, 2017. 36(5): p. 509-519.
92. Gielen, S., et al., *Exercise training in patients with heart disease: review of beneficial effects and clinical recommendations.* **Prog Cardiovasc Dis**, 2015. 57(4): p. 347-55.
93. Desai, S.A. and R.N. Channick, *Exercise in patients with pulmonary arterial hypertension.* **J Cardiopulm Rehabil Prev**, 2008. 28(1): p. 12-6.
94. Chan, L., et al., *Benefits of intensive treadmill exercise training on cardiorespiratory function and quality of life in patients with pulmonary hypertension.* **Chest**, 2013. 143(2): p. 333-343.
95. Mereles, D., et al., *Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension.* **Circulation**, 2006. 114(14): p. 1482-9.
96. Weinstein, A.A., et al., *Effect of aerobic exercise training on fatigue and physical activity in patients with pulmonary arterial hypertension.* **Respiratory Medicine**, 2013. 107(5): p. 778-784.
97. Yılmaz, B.C., et al., *Effects of upper extremity aerobic exercise training on oxygen consumption, exercise capacity, dyspnea and quality of life in patients with pulmonary arterial hypertension.* **Heart & Lung**, 2020.
98. Ehlken, N., et al., *Exercise training improves peak oxygen consumption and haemodynamics in patients with severe pulmonary arterial hypertension and inoperable chronic thrombo-embolic pulmonary hypertension: a prospective, randomized, controlled trial.* **Eur Heart J**, 2016. 37(1): p. 35-44.
99. McLaughlin, V.V., et al., *ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association: developed in collaboration with the American College of*

- Chest Physicians, American Thoracic Society, Inc., and the Pulmonary Hypertension Association. **Circulation**, 2009. 119(16): p. 2250-94.*
100. Silva, F.J., et al., *Continuous Aerobic Exercise Prevents Detrimental Remodeling and Right Heart Myocyte Contraction and Calcium Cycling Dysfunction in Pulmonary Artery Hypertension. **J Cardiovasc Pharmacol**, 2021. 77(1): p. 69-78.*
  101. Natali, A.J., et al., *Voluntary exercise delays heart failure onset in rats with pulmonary artery hypertension. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 2015. 309(3): p. H421-4.*
  102. Soares, L.L., et al., *Voluntary running counteracts right ventricular adverse remodeling and myocyte contraction impairment in pulmonary arterial hypertension model. **Life Sci**, 2019. 238: p. 116974.*
  103. González-Saiz, L., et al., *Benefits of skeletal-muscle exercise training in pulmonary arterial hypertension: The WHOLEi+12 trial. **International Journal of Cardiology**, 2017. 231: p. 277-283.*
  104. *American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Med Sci Sports Exerc**, 2009. 41(3): p. 687-708.*
  105. Schoenfeld, B.J., *The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. **J Strength Cond Res**, 2010. 24(10): p. 2857-72.*
  106. Ikedo, A., et al., *The effects of resistance training on bone mineral density and bone quality in type 2 diabetic rats. **Physiological reports**, 2019. 7(6): p. e14046-e14046.*
  107. Neves, R.V.P., et al., *Resistance Training in Spontaneously Hypertensive Rats with Severe Hypertension %J **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 2016. 106: p. 201-209.*
  108. Souza, M.V.C., et al., *Resistance training and hormone replacement increase MMP-2 activity, quality and quantity of bone in ovariectomized rats. **Motriz: Revista de Educação Física**, 2017. 23(4).*
  109. McLeod, J.C., T. Stokes, and S.M. Phillips, *Resistance Exercise Training as a Primary Countermeasure to Age-Related Chronic Disease. **Front Physiol**, 2019. 10: p. 645.*
  110. Hornberger, T.A., Jr. and R.P. Farrar, *Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can J Appl Physiol**, 2004. 29(1): p. 16-31.*
  111. Padilha, C.S., et al., *Moderate vs high-load resistance training on muscular adaptations in rats. **Life Sci**, 2019. 238: p. 116964.*

112. Perilhão, 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*. **J Hypertens**, 2020. 38(1): p. 73-81.
113. Colombo, R., et al., *Exercise training contributes to H(2)O(2)/VEGF signaling in the lung of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension*. **Vascul Pharmacol**, 2016. 87: p. 49-59.
114. Pacagnelli, F.L., et al., *Preventive aerobic training exerts a cardioprotective effect on rats treated with monocrotaline*. **International journal of experimental pathology**, 2016. 97(3): p. 238-247.
115. Mutiso, S.K., D.K. Rono, and F. Bukachi, *Relationship between anthropometric measures and early electrocardiographic changes in obese rats*. **BMC Res Notes**, 2014. 7: p. 931.
116. Carneiro-Júnior, M.A., *Treinamento físico de baixa intensidade e destreinamento: avaliação das propriedades morfológicas e mecânicas de miócitos cardíacos de ratos espontaneamente hipertensos*. Viçosa. *Dissertação [Mestrado em Educação Física] – Universidade Federal de Viçosa, 2009*.
117. Carneiro-Júnior, M.A., *Efeitos do treinamento físico e do destreinamento sobre propriedades moleculares e mecânicas de cardiomiócitos isolados de ratos normotensos e hipertensos*. Vitória. *Tese [Doutorado em Ciências Fisiológicas] – Universidade Federal do Espírito Santo, 2013*.
118. Tibana, R.A., et al., *The Effects of Resistance Training Volume on Skeletal Muscle Proteome*. **Int J Exerc Sci**, 2017. 10(7): p. 1051-1066.
119. Gabriel, D.A., G. Kamen, and G. Frost, *Neural adaptations to resistive exercise: mechanisms and recommendations for training practices*. *Sports Med*, 2006. 36(2): p. 133-49.
120. Harrison, A., N. Hatton, and J.J. Ryan, *The right ventricle under pressure: evaluating the adaptive and maladaptive changes in the right ventricle in pulmonary arterial hypertension using echocardiography (2013 Grover Conference series)*. **Pulm Circ**, 2015. 5(1): p. 29-47.
121. Faria, T.d.O., et al., *A Single Resistance Exercise Session Improves Aortic Endothelial Function in Hypertensive Rats*. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, 2017. 108(3): p. 228-236.
122. Shimojo, G.L., et al., *Dynamic resistance training decreases sympathetic tone in hypertensive ovariectomized rats*. **Braz J Med Biol Res**, 2015. 48(6): p. 523-7.
123. da Palma, R.K., et al., *Resistance or aerobic training decreases blood*

- pressure and improves cardiovascular autonomic control and oxidative stress in hypertensive menopausal rats. J Appl Physiol (1985)*, 2016. 121(4): p. 1032-1038.
124. Hardziyenka, M., et al., *Electrophysiologic remodeling of the left ventricle in pressure overload-induced right ventricular failure. J Am Coll Cardiol*, 2012. 59(24): p. 2193-202.
  125. Fowler, E.D., et al., *Beta1-adrenoceptor antagonist, metoprolol attenuates cardiac myocyte Ca<sup>2+</sup> handling dysfunction in rats with pulmonary artery hypertension. Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2018. 120: p. 74-83.
  126. Hardziyenka, M., et al., *Right Ventricular Failure Following Chronic Pressure Overload Is Associated With Reduction in Left Ventricular Mass: Evidence for Atrophic Remodeling. Journal of the American College of Cardiology*, 2011. 57(8): p. 921-928.
  127. Strauss, B., et al., *Intra-tracheal gene delivery of aerosolized SERCA2a to the lung suppresses ventricular arrhythmias in a model of pulmonary arterial hypertension. J Mol Cell Cardiol*, 2019. 127: p. 20-30.
  128. Morioka, S., et al., *Changes in contractile and non-contractile proteins, intracellular Ca<sup>2+</sup> and ultrastructures during the development of right ventricular hypertrophy and failure in rats. Jpn Circ J*, 1992. 56(5): p. 469-74.
  129. Shi, R., et al., *Baicalein attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition. Life Sci*, 2018. 207: p. 442-450.
  130. 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. Life Sciences*, 2020: p. 117848.
  131. Catal, F., et al., *A human monoclonal anti-TNF alpha antibody (adalimumab) reduces airway inflammation and ameliorates lung histology in a murine model of acute asthma. Allergol Immunopathol (Madr)*, 2015. 43(1): p. 14-8.
  132. Bernocchi, P., et al., *Skeletal Muscle Metabolism in Experimental Heart Failure. Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 1996. 28(11): p. 2263-2273.
  133. Ivanov, K.P., *Circulation in the lungs and microcirculation in the alveoli. Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2013. 187(1): p. 26-30.
  134. Miguel-Reyes, J.L., et al., *Functional respiratory assessment in interstitial lung disease. Rev Invest Clin*, 2015. 67(1): p. 5-14.
  135. Vinke, P., et al., *Anti-inflammatory nutrition with high protein attenuates*

- cardiac and skeletal muscle alterations in a pulmonary arterial hypertension model.* **Sci Rep**, 2019. 9(1): p. 10160.
136. Song, Z., et al., *Resistance exercise initiates mechanistic target of rapamycin (mTOR) translocation and protein complex co-localisation in human skeletal muscle.* **Scientific reports**, 2017. 7(1): p. 5028-5028.
137. Lim, C.H., et al., *Satellite cell activation and mTOR signaling pathway response to resistance and combined exercise in elite weight lifters.* **Eur J Appl Physiol**, 2017. 117(11): p. 2355-2363.
138. Dumont, N.A., et al., *Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration.* **Compr Physiol**, 2015. 5(3): p. 1027-59.
139. Jakobsen, J.R., et al., *Composition and adaptation of human myotendinous junction and neighboring muscle fibers to heavy resistance training.* **Scand J Med Sci Sports**, 2017. 27(12): p. 1547-1559.
140. Guzzoni, V., et al., *Effect of Resistance Training on Extracellular Matrix Adaptations in Skeletal Muscle of Older Rats.* **Front Physiol**, 2018. 9: p. 374.
141. Rain, S., et al., *Right ventricular diastolic impairment in patients with pulmonary arterial hypertension.* **Circulation**, 2013. 128(18): p. 2016-25, 1-10.
142. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling.* **Nature**, 2002. 415(6868): p. 198-205.
143. Melo, S.F.S., et al., *Resistance training regulates cardiac function through modulation of miRNA-214.* **International journal of molecular sciences**, 2015. 16(4): p. 6855-6867.
144. Dantas, P.S., et al., *Unraveling the role of high-intensity resistance training on left ventricle proteome: Is there a shift towards maladaptation?* **Life Sciences**, 2016. 152: p. 156-164.
145. Carneiro-Júnior, M.A., et al., *The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining.* **J Mol Cell Cardiol**, 2013. 57: p. 119-28.

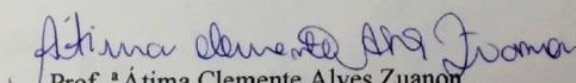
## 9. ANEXO 1 – Parecer de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 95/2018, intitulado “**Efeitos do treinamento resistido prévio na progressão da hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina**”, 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 21/02/2019, com validade de 12 meses.

### CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 95/2018, named “**Effects of previous resistance training on the progression of monochrotalin-induced pulmonary arterial hypertension**”, is in agreement with the a actual Brazilian legislation ( Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on February 21, 2019 valid for 12 months.

  
Prof. ª Átima Clemente Alves Zuanon  
Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV