

FILIPPE RIOS DRUMMOND

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO DE CORRIDA VOLUNTÁRIA EM MÚSCULO
ESQUELÉTICO E EM PULMÃO DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA
HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR EXPERIMENTAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para a
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Clóvis Andrade Neves

Coorientador: Antônio José Natali

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

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

T

Drummond, Filipe Rios, 1990-
D795i Influência do exercício de corrida voluntária em músculo
2020 esquelético e em pulmão durante o desenvolvimento da
 hipertensão arterial pulmonar experimental / Filipe Rios
 Drummond. – Viçosa, MG, 2020.
 50 f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Clóvis Andrade Neves.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.45-49.

1. Hipertensão Arterial Pulmonar. 2. Exercício Físico.
3. Monocrotalina. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 616.24

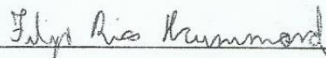
FILIPPE RIOS DRUMMOND

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO DE CORRIDA VOLUNTÁRIA EM MÚSCULO
ESQUELÉTICO E EM PULMÃO DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA
HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR EXPERIMENTAL**

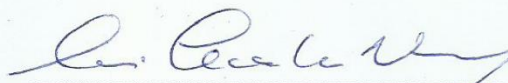
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 18 de março de 2020

Assentimento:



Filipe Rios Drummond
Autor



Clóvis Andrade Neves
Orientador

Aos meus pais, Eduardo (in memoriam) e Giselle, pilares da minha formação.

Aos meus irmãos, Lucas e André, pela torcida.

À Laiz, por todo amor e carinho.

A toda minha família pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar o meu caminho.

Aos meus pais Eduardo (in memoriam) e Giselle pela minha formação pessoal, e por sempre acreditarem em mim.

À Laiz por todo amor, carinho, companheirismo e paciência, mesmo nos momentos mais difíceis e na minha ausência. Te amo!

Aos meus irmãos Lucas e André pelo carinho e amizade, e por acreditarem em mim.

À toda minha família pelo carinho e orações.

À toda família da Laiz pelo apoio e por me fazer sentir parte da família.

Ao professor Clóvis Andrade Neves pela oportunidade, pelo apoio, exemplos, ensinamentos, conselhos, competência, ética, pela admirável humildade e pela referência de profissional.

Ao professor Antônio José Natali pela co-orientação, oportunidade ainda no início da graduação, pela referência de profissional, humildade e viabilização de análises no Laboratório de Biologia do Exercício (BioEx) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Ao professor Miguel Araújo Carneiro Júnior pela amizade, ajuda ainda no início da graduação, pela referência profissional, viabilização da realização de análises e importante presença no seminário de defesa.

À professora Emily pela disponibilidade, competência na colaboração do trabalho e importante presença no seminário de defesa.

À professora Mariana Machado Neves pela disponibilidade, competência na colaboração do trabalho e viabilização de análises no Laboratório de Biologia Estrutural da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Ao professor Sérgio Luís Pinto da Matta pela disponibilidade no exame de qualificação e pela importante presença no seminário de defesa.

Ao professor Rômulo Novaes pela importante presença no seminário de defesa.

À professora Luciane Alberici pela atenção ao me receber em seu laboratório e viabilização de análises no Laboratório de Metabolismo e Exercício da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (USP).

Ao professor Sérgio de Paula pela viabilização de análises no Laboratório de Imunovirologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Aos amigos do BioEx: Leôncio, Meilene, Denise, Anselmo, Leonardo, Franciane, Tiago, Aurora, Alexandre Dantas, Alexandre Martins, Emanuel, Pedro Zavagli, e Juliano pela troca de conhecimento, trabalhos em conjunto e momentos de diversão.

Ao Afrânio, Arthur, César, Bárbara, Camila, Mateus, Rodrigo e Victor pela amizade e momentos de diversão.

À secretária da Pós-Graduação da Biologia, Beth, sempre apoiando e socorrendo os estudantes com muita gentileza e carinho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade e apoio na minha formação profissional.

À UFV e todos seus funcionários que contribuíram direta ou indiretamente para realização desse trabalho.

À população brasileira, que através da CAPES, CNPq e FAPEMIG financiaram a realização do projeto e mais um período da minha formação profissional e científica.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

DRUMMOND, Filipe Rios, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2020. **Influência do exercício de corrida voluntária em músculo esquelético e em pulmão durante o desenvolvimento da hipertensão arterial pulmonar experimental.** Orientador: Clóvis Andrade Neves. Coorientador: Antônio José Natali.

Fundamento: A intolerância ao exercício é um importante sintoma da falha cardíaca do ventrículo direito causada pela Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP) e as adaptações sofridas pelo músculo esquelético e pelos pulmões desempenham um papel chave nesta limitação. O efeito do treinamento físico sobre o músculo esquelético (ME) e sobre os pulmões durante a HAP em ensaios pré-clínicos permanece pouco estudado, mas podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias para o entendimento e tratamento da doença. **Objetivo:** Examinar os efeitos do treinamento em corrida voluntária, realizado durante a fase de desenvolvimento da HAP, sobre a estrutura do ME, a biogênese mitocondrial e o metabolismo oxidativo no ME, o estresse oxidativo no ME, o estado inflamatório do ME e dos pulmões e a função endotelial do ME e dos pulmões de ratos com HAP induzida por monocrotalina (MCT). **Métodos:** Ratos Wistar (~230g) foram divididos em cinco grupos: sedentário controle (SC, n=8); sedentário com falha cardíaca (SF, n=8); exercitado controle (EC, n=8); exercitado média (EM, n=8) e exercitado com falha cardíaca (EF, n=8). Os animais dos grupos EC, EM e EF tiveram livre acesso à roda de corrida voluntária. O grupo EM teve os parâmetros avaliados na média de sobrevida (± 1 dia) dos animais SF para comparação temporal. Os animais dos grupos EF, SF e EM receberam uma injeção intraperitoneal (60 mg/kg de peso corporal) de monocrotalina (MCT), enquanto os controles (EC e SC) receberam a mesma dose de solução salina. O tempo total de exercício até a fadiga (TTF) em corrida em esteira, um índice de tolerância ao esforço físico, foi medido antes da aplicação de MCT, nos 21º, 26º (grupos EC, EF, SC e SF) e no 23º (grupo EM) dias após aplicação. A avaliação ecocardiográfica foi realizada nos 22º, 25º (grupos: EC, EF, SC e SF) e 27º (grupo: EM) dias após a aplicação de MCT. Após manifestação dos sinais da falha cardíaca (SF, EF, EC e SC), os animais foram sacrificados e os músculos sóleo e gastrocnêmio, além do pulmão direito foram coletados para análises dos parâmetros teciduais (histomorfometria), bioquímicos (citrato sintase e proteína carbonilada) e moleculares (expressão gênica de PGC1- α , TNF- α , IL-10, VEGF). No grupo EM (n=8) isto ocorreu no 28º dia após injeção de MCT. **Resultados:** O treinamento em corrida voluntária retardou o aparecimento dos sinais de falha cardíaca (SF = ~28 dias; EF= ~32 dias, $p < 0,05$), aumentou a tolerância ao esforço físico e retardou os prejuízos na resistência da artéria

pulmonar. Em nível tecidual, o treinamento aumentou o percentual de fibra muscular, atenuando os prejuízos causados pela HAP. Em nível molecular, os animais EF apresentaram uma maior razão TNF- α /IL-10 em relação aos animais do grupo EC. A HAP diminuiu a expressão de PGC1- α nos grupos SF e EM, entretanto o grupo EF apresentou maior expressão desse gene em relação ao EC. Da mesma forma a expressão de VEGF foi maior nos grupos SF e EM em relação ao grupo SC. **Conclusão:** O treinamento em corrida voluntária aumentou a sobrevivência, promoveu benefícios à estrutura tecidual do ME, assim como aumentou a expressão de PGC-1 α no ME e ainda diminuiu a resistência arterial pulmonar de ratos com HAP induzida por MCT.

Palavras-chave: Corrida voluntária. Esforço físico. Músculo esquelético. Monocrotalina; Falha cardíaca.

ABSTRACT

DRUMMOND, Filipe Rios, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2020. **Influence voluntary exercise in skeletal muscle and lungs during the experimental pulmonary arterial hypertension development.** Adviser: Clóvis Andrade Neves. Co-adviser: Antonio José Natali.

Background: Exercise intolerance is an important symptom of right ventricular heart failure caused by Pulmonary Arterial Hypertension (PAH) and skeletal muscle and lungs adaptations play a role in this limitation. The effect of exercise training on skeletal muscle and lungs in the pre-clinical settings of PAH remains poorly studied. Studies on strategies for treatment of the disease are necessary. **Objective:** To examine the effects of training in voluntary running during the development of PAH on skeletal muscle structure, biogenesis and mitochondrial metabolism in skeletal muscle, oxidative stress in the skeletal muscle, the inflammatory state in the skeletal muscle and lung, and the endothelial function in skeletal muscle and lung of rats with monocrotaline-induced PAH (MCT). **Methods:** Wistar rats (~ 230g) were divided into five groups: sedentary control (SC, n = 8); sedentary heart failure (SF, = 8); exercised control (EC, n = 8); average exercised (AE, n = 8) and exercised with heart failure (EF, n = 8). Animals from groups EC, AE and EF had free access to the voluntary running wheel. The AE group had the parameters evaluated in the mean survival (\pm 1 day) of SF animals for temporal comparison. Animals of the EF, SF and AE groups received an intraperitoneal (60 mg/kg body weight) injection of monocrotaline (MCT), while control groups (EC and SC) received the same dose of saline solution. The total exercise time until fatigue (TTF) in treadmill running, a physical effort tolerance index, was measured before the application of MCT, and at 21st, 27th (EC, EF, SC and SF groups) and at 26rd (AE group) days after application. The echocardiographic evaluation was performed at 22nd, 27th (groups: EC, EF, SC and SF) and 24th (group: AE) days after the application of MCT. Tissue parameters (histomorphometry) biochemical parameters (citrate synthase and carbonylated protein) and molecular parameters (gene expression of PGC1- α , TNF- α , IL-10, VEGF) were evaluated after signs of heart failure (SF, EF, EC and SC). In the EM group (n = 8) this occurred on the 28th day after MCT injection. **Results:** Training in voluntary running delayed the onset of signs of heart failure (SF = ~ 28 days, EF = ~ 32 days, $p < 0.05$), raised exercise tolerance and postponed reduction of pulmonary artery resistance. At the tissue level, training increased the percentage of muscle fiber, attenuating the damages caused by PAH. At the molecular level, EF animals presented a higher TNF- α / IL-10 ratio in relation to the animals in the EC group. PAH decreased the expression of PGC1- α in the SF

and MS groups, however the EF group had higher expression of this gene in relation to the CE. Likewise, the VEGF expression was higher in the SF and MS groups than in the SC group.

Conclusion: Voluntary career training promotes the tissue evolution of the ME, as well as the mitochondrial biogenesis in the ME, and also the pulmonary arteriolar resistance of rats with the PAH induced by MCT.

Keywords: Voluntary exercise. Physical effort. Skeletal muscle. Monocrotaline. Heart failure.

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt – Proteína quinase B
ANOVA – Análise de variância
BMPR2 – Receptor de proteína morfogênica óssea 2
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CoA – Coenzima A
DPM – Desvio Padrão da Média
DTNB – Reagente de Ellman
EC – Exercício Controle
EF – Exercício falha
EM – Exercício Média
HAP – Hipertensão Arterial Pulmonar
HCl – Ácido Clorídrico
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
HP – Hipertensão pulmonar
IL – Interleucinas
IRS – Substrato do receptor de insulina
MCT – Monocrotalina
ME – Músculo esquelético
mg/kg – Razão miligrama por quilograma
MHC-I – Isoforma da miosina de cadeia pesada I
mmHg – Milímetros de mercúrio
mTOR – Alvo de rapamicina em mamíferos
NaCl – Cloreto de sódio
O₂ – Oxigênio
OMS – Organização Mundial da Saúde
PAPm – Pressão arterial pulmonar média
PC – Peso corporal
PCP – Pressão capilar pulmonar
PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase
PV – Peso dos ventrículos
PVD – Peso do ventrículo direito
PVE – Peso do ventrículo esquerdo

qRT – PCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

RNA – Ácido ribonucleico

RNAm – RNA mensageiro

rpm – Rotações por minuto

RVP – Resistência vascular pulmonar

SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório

SC – Sedentário controle

SF – Sedentário falha

TA – Tempo de aceleração

TA/TE – Razão tempo de aceleração pelo tempo de ejeção

TE – Tempo de Ejeção

TNF- α – Fator de necrose tumoral

TTF – Tempo total de exercício até a fadiga

VD – Ventrículo direito

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Sobrevivência medida nos dias de aparecimento dos sinais de falha cardíaca....	29
Figura 2. Tolerância ao exercício.....	30
Figura 3. Dados ecocardiográficos.....	31
Figura 4. Parâmetros histológicos do gastrocnêmio.....	33
Figura 5. Expressão relativa da razão de mRNA de TNF- α :IL-10 no gastrocnêmio e no pulmão	34
Figura 6. Expressão relativa de mRNA de PGC1- α no gastrocnêmio e atividade da Citrato Sintase no óleo.....	35
Figura 7. Expressão relativa de mRNA de VEGF e VEGFR-2 no gastrocnêmio e no pulmão	36
Figura 8. Expressão relativa de mRNA de ET-1 no pulmão	37
Figura 9. Concentração de proteína carbonilada no sóleo.....	38

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Sequência dos primers para PCR em tempo real.....	27
Tabela 2. Peso corporal, dos órgãos e razões.....	32

SUMÁRIO

REVISÃO DE LITERATURA.....	15
OBJETIVOS.....	19
HIPÓTESE.....	20
Capítulo 1	
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3. RESULTADOS.....	28
4. DISCUSSÃO.....	38
5. CONCLUSÕES.....	44
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
10. ANEXO 1	50

REVISÃO DE LITERATURA

A hipertensão pulmonar (HP) é um distúrbio fisiopatológico que pode envolver múltiplas condições clínicas e pode ainda agravar a maioria das doenças cardiovasculares e respiratórias [1]. Pessoas de todas as faixas etárias da população são afetadas por essa desordem, porém com maior acometimento em idosos. A prevalência de HP é de cerca de 1% da população mundial, e aumenta até 10% em indivíduos com mais de 65 anos [2]. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou a HP em 5 grandes grupos de acordo com similaridades clínicas, patológicas, hemodinâmicas e nas estratégias de tratamento. São eles: 1) HP associada com doenças cardíacas esquerdas; 2) HP associada com doenças respiratórias e/ou hipóxia; 3) doença tromboembólica crônica; 4) mecanismos multifatoriais pouco claros; e 5) hipertensão arterial pulmonar (HAP).

A HAP é uma doença progressiva do sistema vascular pulmonar, afetando principalmente as pequenas arteríolas pulmonares [3]. A HAP tem incidência relatada de 1,1 a 17,6 por milhão de adultos por ano e prevalência de 6,6 a 26,0 por milhão de adultos [4]. A HAP possui um prognóstico pobre, com uma taxa de aproximadamente 15% de mortalidade no primeiro ano após o diagnóstico, mesmo com o tratamento [5]. Ela pode ser definida pela pressão arterial pulmonar média (PAPm) acima de 25 mmHg e pressão capilar pulmonar menor que 15 mmHg e ainda uma resistência vascular pulmonar (RVP) > 3 unidades *Wood* [6]. A HAP é clinicamente heterogênea, compreendendo pacientes com HAP sem causa óbvia (denominada HAP idiopática), HAP hereditária, HAP induzida por medicamentos e HAP associada com: 1) doença do tecido conjuntivo; 2) HIV; 3) hipertensão portal; 4) doenças cardíacas congênitas; 5) esquistossomose [4]. A HAP caracteriza-se por aumento progressivo da RVP, e dessa forma por um fluxo sanguíneo restrito na circulação arterial pulmonar. Estes fatos ocorrem devido à proliferação e remodelamento do endotélio vascular pulmonar, trombose *in situ*, resistência à apoptose, inflamação e fibrose mediada pelo remodelamento da matriz extracelular das artérias e arteríolas pulmonares, que resulta em aumento da RVP e, em última instância, na falha cardíaca [3, 7, 8].

O aumento crônico da RVP leva ao aumento da pós-carga do ventrículo direito (VD). Essa sobrecarga gera uma resposta adaptativa ou remodelamento adverso do VD. Este quadro conduz à insuficiência ventricular direita à medida que os danos estruturais e funcionais progridem [9]. A falha cardíaca é a maior causa de morte entre os pacientes com HAP [5, 10]. Além da obstrução observada nos vasos pulmonares e do remodelamento do VD, como descrito

anteriormente, vários outros órgãos são acometidos pela doença, como exemplo temos os músculos esqueléticos (ME) e os pulmões [11].

Os sintomas mais comumente relatados na HAP são dispneia e fadiga, que limitam a capacidade física e a qualidade de vida dos indivíduos acometidos [12]. A intolerância ao exercício físico é uma característica fundamental da HAP e foi tradicionalmente atribuída ao baixo débito cardíaco e disfunção respiratória [11]. Vários estudos já destacaram uma ampla gama de anormalidades dos músculos esqueléticos [13-15] e de músculos respiratórios [16, 17] em pacientes com HAP que podem contribuir para a limitação ao exercício físico. O desgaste e fraqueza muscular causados pela HAP podem ser explicados pelos seguintes fatores: mudança do tipo de fibra muscular, do tipo I para o tipo II, redução na densidade capilar muscular, menor atividade de enzimas da via aeróbica, biogênese/função mitocondrial prejudicada e aumento da degradação proteica muscular mediada pelo sistema ubiquitina-proteassoma [13, 15].

Para entender melhor a HAP, modelos pré-clínicos emergem para auxiliar na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos e também na investigação de novas estratégias terapêuticas [18]. O modelo animal deveria mimetizar a doença no ser humano e permitir a determinação de aspectos clínicos, bioquímicos, hemodinâmicos e características histopatológicas. No entanto, nenhum modelo simula exatamente todas as características da HAP em humanos [18]. Diferentes modelos experimentais foram desenvolvidos e, dentre eles estão: hipóxia crônica; lesão por monocrotalina (MCT); MCT e pneumonectomia; Sugen 5416; e, hipóxia e modelos *knockout* para receptor de proteína morfogênica óssea 2 (BMP2) [19, 20]. O modelo de MCT talvez seja o que mais contribuiu para a compreensão da fisiopatologia e desenvolvimento terapêutico da HAP por reproduzir em vários aspectos chaves a HAP humana [18].

A MCT é um alcaloide presente nas hastes, folhas e sementes da planta *Crotalaria spectabilis* e em menor concentração nas outras plantas do gênero *Crotalaria* [18]. Embora a MCT já venha sendo utilizada em estudos há mais de 50 anos [21, 22], o mecanismo pelo qual a administração da MCT provoca HAP permanece pouco compreendido. As lesões nos órgãos causadas pela MCT ocorrem após a absorção da droga pelo fígado e a consequente produção de um metabólito chamado de dehidromonocrotalina, que é tóxico [23-26]. Este composto é degradado rapidamente no organismo, porém se acumula facilmente nos eritrócitos, e por essa razão seus efeitos começam a ser observados já poucas horas após aplicação de MCT até a morte do animal [25, 27].

Sabe-se que a injeção de uma dose de MCT (30-60 mg/Kg), usualmente intraperitoneal ou subcutânea, provoca o aumento da proliferação de células musculares lisas dos vasos

pulmonares levando à hipertrofia destes vasos com conseqüente espessamento das artérias pulmonares proximais e adventícias, fibrose e enrijecimento [18]. Além disso, a lesão por MCT, pode causar primeiramente danos renais significativos e posteriormente, doença veno-oclusiva hepática, hipertrofia e disfunção significativa do VD [19, 20].

O ME também pode ser comprometido pela HAP, porém, até o momento não existe explicação clara sobre como a HAP afeta o ME. O aumento da resposta inflamatória relatado anteriormente, juntamente com uma sinalização insulina/anabolismo insuficiente, hipoxemia e anormalidades na função/biogênese mitocondrial são os prováveis mecanismos envolvidos na perda muscular, devido ao desbalanço síntese/degradação proteica [11].

As citocinas pró inflamatórias podem afetar o ME prejudicando sua contração e aumentando sua proteólise [11]. Níveis elevados de interleucinas (IL) circulantes como: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10 além do fator de necrose tumoral (TNF- α) foram encontrados em modelos animais e humanos com HAP [28, 29]. Esse aumento de marcadores pró-inflamatórios crônicos pode prejudicar a sinalização anabólica do substrato do receptor de insulina (IRS)/fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/proteína quinase B (Akt) [30]. O TNF- α é um mediador para redução da sinalização da via IRS/PI3K/Akt nas células musculares, além do fato de que seu aumento está associado à resistência à insulina. [31-35]. Já a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória clássica. Estudo prévio mostrou que a IL-10 desempenha um papel na modulação do metabolismo da glicose no músculo esquelético. A citocina foi capaz de reduzir a resistência à insulina induzida por TNF- α em camundongos com esteatose hepática induzida por dieta *high-fat* [34].

É provável que a hipoxemia crônica também esteja envolvida na disfunção muscular [36]. A microcirculação do ME de pessoas com HAP parece estar prejudicada, evidenciado pela baixa saturação de O₂ do tecido [37]. Essa anormalidade na distribuição de O₂ microvascular foi encontrada em pacientes com HAP [38] ocasionando uma diminuição na taxa de utilização do metabolismo aeróbico e conseqüentemente um aumento na ativação da via metabólica anaeróbica da glicose [39].

E por último, as anormalidades na função e biogênese mitocondrial também podem colaborar no processo de atrofia muscular [11, 40]. Foi verificado uma diminuição na biogênese mitocondrial no músculo gastrocnêmio em modelo de ratos com HAP [41]. Além disso, nesse mesmo modelo foi relatado o comprometimento da função respiratória mitocondrial no músculo plantar [42].

Nos últimos 20 anos houve grande avanço no tratamento da HAP. Em relação às terapias farmacológicas atuais disponíveis para o tratamento da HAP, tanto as de suporte

(anticoagulantes, diuréticos, oxigênio suplementar, vasodilatadores), quanto as direcionadas à doença (agentes antiproliferativos) possuem efeito positivo no tratamento da doença e aumento da sobrevivência [43]. Entretanto, nem sempre os medicamentos específicos para HAP estão disponíveis e, mais importante, nem todos os pacientes respondem a esses medicamentos [6]. Diante do exposto, terapias eficientes para o tratamento da doença ou ao menos melhora da qualidade de vida dos pacientes são muito importantes. O exercício físico tem sido reconhecido e recomendado como ferramenta terapêutica não farmacológica eficiente e segura para tratamento de várias doenças crônicas como as pulmonares (ex. doença pulmonar obstrutiva crônica, asma e fibrose cística) e as cardiovasculares (ex. hipertensão, doença coronariana e falha cardíaca) [44, 45].

Apesar de todos os danos causados pela HAP, existem evidências em humanos [46-51] e em modelos animais [52-56] de que o exercício físico pode promover efeitos benéficos na HAP. Os resultados positivos já conhecidos se traduzem em: melhora na qualidade de vida e capacidade funcional, aumento da capacidade de exercício e da eficiência ventilatória, melhora da função cardíaca global, elasticidade arterial e do miocárdio, diminuição da atrofia muscular, combate ao estresse oxidativo, ao processo inflamatório e ao remodelamento cardiopulmonar adverso [52-59].

Todavia, segundo Nogueira-Ferreira et. al., (2018) existem poucos estudos pré-clínicos utilizando modelos animais de HAP para entendimento do efeito do exercício físico sobre o músculo esquelético de animais com a doença. Um estudo mostra que um treinamento de quatro semanas de corrida em esteira antes da aplicação de MCT impediu uma diminuição na área de secção transversa e na expressão da isoforma da miosina de cadeia pesada I (MHC-I) no gastrocnêmio. Além disso, o treinamento físico prévio foi capaz de aumentar as formas fosforiladas da Akt e do alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR), envolvidos na via de síntese proteica [60]. Quando o treinamento físico de corrida em esteira durante 4 semanas foi realizado após a aplicação de MCT, ele foi capaz de aumentar o peso do músculo gastrocnêmio e a área de secção transversa. No entanto, nenhuma informação sobre alterações moleculares estava disponível [54].

Desta forma, o presente estudo foi realizado para testar a hipótese de que o treinamento de corrida voluntária realizado durante a progressão da hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina, atenua os prejuízos impostos pela doença no músculo esquelético e nos pulmões de ratos.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar mecanismos celulares e moleculares envolvidos em adaptações do sistema muscular esquelético e do pulmão ao treinamento físico de corrida voluntária iniciado durante o desenvolvimento da HAP experimental em ratos.

Objetivos Específicos

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

- a) A sobrevivência;
- b) A tolerância ao esforço físico;
- c) A hemodinâmica da artéria pulmonar;
- d) A morfometria tecidual do ME; verificar
- e) O estado inflamatório do ME e dos pulmões;
- f) A biogênese e o metabolismo mitocondrial do ME;
- g) O estresse oxidativo no ME;
- h) Indicadores de função endotelial no ME e nos pulmões.

HIPÓTESES

H₀ - Esta hipótese se contrapõe à hipótese a seguir.

H₁ - O treinamento de corrida voluntária realizado durante a progressão da HAP induzida por MCT atenua os prejuízos impostos pela doença no ME e nos pulmões de ratos. Verificar a necessidade

Capítulo1:**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO DE CORRIDA VOLUNTÁRIA EM MÚSCULO ESQUELÉTICO E EM PULMÃO DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR EXPERIMENTAL**

Filipe R. Drummond¹; Leôncio L. Soares²; Tiago F. Leal²; Leonardo M. T. Rezende²; Meilene R. Fidelis²; Victor Neiva Lavorato²; Denise C. Miranda²; Miguel A. Carneiro-Júnior²; Mariana M. Neves¹; Luciane C. Alberici⁴; Emily C. C. Reis³; Clovis A. Neves¹; Antônio J. Natali².

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

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

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

4- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, Brasil;

1. Introdução

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença caracterizada por aumento crônico da resistência vascular pulmonar (RVP), com subsequente disfunção do ventrículo direito (VD) podendo levar à morte prematura [61]. Um dos principais sintomas da HAP é a intolerância ao esforço físico que normalmente é atribuída ao baixo débito cardíaco e à disfunção respiratória [11]. Além do remodelamento vascular pulmonar característico da HAP [53, 54, 62], estudos sugerem que a HAP pode causar vários tipos de anormalidades intrínsecas ao músculo esquelético resultando em desgaste e fraqueza muscular, que podem ser explicados pelos seguintes fatores: mudança do tipo de fibra muscular, do tipo I para o tipo II, redução na densidade capilar muscular, menor atividade de enzimas da via aeróbica, biogênese/função mitocondrial prejudicada e aumento da degradação proteica muscular mediada pelo sistema ubiquitina-proteassoma (UPS) [13, 15].

O modelo mais utilizado para estudar os efeitos da HAP no organismo é o modelo de lesão por monocrotalina (MCT) [18]. A MCT é um alcaloide presente nas hastes, folhas e sementes da planta *Crotalaria spectabilis*. Sabe-se que a injeção de uma dose de MCT (30-60 mg/Kg), usualmente intraperitoneal ou subcutânea, provoca o aumento da proliferação de células musculares lisas dos vasos pulmonares levando à hipertrofia destes vasos com consequente espessamento das artérias pulmonares proximais e adventícias, fibrose e enrijecimento [18].

Já foi registrado tanto em modelos animais quanto em pacientes com HAP um aumento nos níveis de interleucinas (IL) circulantes (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10) além do fator de necrose tumoral (TNF- α) [28, 29]. Esse aumento de marcadores pró-inflamatórios pode induzir um desbalanço síntese/degradação proteica no músculo esquelético [29]. Além disso sabe-se que a hipoxemia crônica [36] e as anormalidades na função/biogênese mitocondrial [11, 40] também estão envolvidas na disfunção e atrofia muscular.

As terapias farmacológicas atuais disponíveis para o tratamento da HAP possuem efeito positivo, mas a doença continua sendo progressiva e sem cura [43]. Portanto, terapias eficientes para o tratamento da doença ou ao menos melhora da qualidade de vida dos pacientes são muito importantes.

Existem poucos estudos utilizando modelos animais com indução de HAP para entendimento do efeito do exercício físico sobre o músculo esquelético de animais com a doença [61]. Um treinamento físico prévio à aplicação de MCT impediu uma diminuição na área de secção transversa e na expressão da isoforma miosina da cadeia pesada I (MHC-I) no

gastrocnêmio. Além disso, foi capaz de aumentar as formas fosforiladas da Akt e do alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR), envolvidos na via de síntese proteica [60]. Sabe-se também que treinamento físico realizado em esteira foi capaz de aumentar o peso e a área de secção transversa do músculo gastrocnêmio [54].

Já o impacto do exercício físico no tecido pulmonar de animais experimentais com HAP permanece inconclusivo [61]. Estudos prévios mostram que o exercício físico foi capaz de aumentar a expressão gênica da óxido nítrico sintase (eNOS) [62], além de estimular a angiogênese pulmonar [52]. Entretanto, outros estudos mostraram que não foi observada melhora na circulação sanguínea pulmonar [63, 64]. Em contradição a esses achados, Handoko e colaboradores (2009) apresentam resultados em que o exercício físico causou uma piora no remodelamento vascular pulmonar, acentuando ainda mais os efeitos deletérios provocados pela HAP. Portanto, apesar dos avanços do conhecimento neste tema, os efeitos de exercício físico sobre o ME e sobre o pulmão em modelo de HAP induzida por MCT não estão bem estabelecidos e necessitam maiores investigações.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais e Corrida Voluntária

Ratos Wistar (~230g) com 60 dias de idade foram alojados individualmente em gaiolas de policarbonato transparente (Modelo 80859S, *Lafayette Instrument Company, Indiana, USA*) equipada com rodas de atividade em aço inoxidável (diâmetro: 14” (35,56 cm); largura: 4,3” (10,92 cm) de livre acesso. O número de giros foi registrado usando-se contador magnético digital (Ciclocomputador-AS820 - Assize), o que permitiu o cálculo da distância diária percorrida. Estes animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: exercitado controle (EC, n = 8), exercitado média (EM, n = 8) e exercitado com falha cardíaca (EF, n = 8). Outro grupo de ratos da mesma linhagem e com mesmo peso não teve acesso à roda de corrida e foram alojados aleatoriamente em gaiolas de policarbonato transparente, sendo 4 animais por gaiola. Esses animais, por sua vez, foram divididos em mais dois grupos: sedentário controle (SC, n=8) e sedentário com falha cardíaca (SF, n = 8). O grupo EM teve os parâmetros avaliados na média de sobrevivência (\pm 1 dia) dos animais SF para comparação temporal. Os demais grupos tiveram os parâmetros avaliados após manifestação de sinais clínicos de falha do VD (ex. perda de 10g do peso corporal por dia e/ou dispnéia; cianose; letargia).

Diariamente, às 08h00min, foram registradas as variáveis: distância e duração do exercício de cada animal. Todos os animais tiveram acesso à água e ração *ad libitum* e permaneceram em sala silenciosa com ciclos de 12/12 h claro/escuro, temperatura controlada (~ 22° C) e umidade relativa de ~ 60%. Os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (parecer nº 14/2017).

2.2. *Indução da Hipertensão Arterial Pulmonar*

Os animais dos grupos EF, SF e EM receberam uma única injeção intraperitoneal de 60 mg/kg de peso corporal de MCT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) dissolvida em solução salina (NaCl 140 mM; pH 7.4) para o desenvolvimento da HAP e/ou falha do VD [65]. Animais controles (EC e SC) receberam a mesma dose de solução salina (NaCl 140 mM; pH 7,4).

2.3. *Teste de tolerância ao esforço físico*

O tempo total de exercício até a fadiga (TTF) foi usado como índice de tolerância ao esforço físico. O protocolo do TTF foi realizado conforme descrito anteriormente [66]. Resumidamente, antes do início do programa de treinamento físico, os animais foram colocados em uma esteira rolante elétrica (AVS Projetos®, São Paulo, Brasil) para adaptação (10 min/dia, 5 m/min, sem inclinação) por 3 dias. Quarenta e oito horas após o período de adaptação foi realizado o teste, onde os animais iniciaram o exercício a 5 m/min, sem inclinação. Foram feitos incrementos de 3 m/min a cada 3 minutos até a fadiga. A fadiga foi determinada quando o animal permaneceu durante 10 segundos em uma grade com estímulo elétrico ajustado para 0,28 mA equipada junto a esteira. O teste foi realizado uma semana antes da aplicação de MCT em todos os grupos experimentais. No 21º dia após aplicação o teste foi feito nos grupos EC, EF, SC e SF. No 26º dia após aplicação o teste foi feito apenas no grupo EM. No 27º dia após aplicação o teste foi feito nos grupos EC, EF, SC e SF.

2.4. *Exame ecocardiográfico*

A avaliação ecocardiográfica foi realizada no 22º e no 25º dia após a aplicação de MCT nos grupos EC, EF, SC e SF, e no 27º dia no grupo EM. Os animais foram imobilizados por anestesia (Isoflurano 1,5% e oxigênio 100% em fluxo constante de 1L/min; Isoflurano, BioChimico, RJ, Brasil). As imagens foram obtidas enquanto os animais permaneciam em decúbito lateral. Estudos bidimensionais com taxa de amostragem rápida de 120 fps (*frame per*

second) em modo M foram realizados utilizando-se o sistema de ultrassom MyLabTM30 (Esaote, Genoa, Itália) e transdutores de 11 MHz de frequência nominal. O ecocardiograma transtorácico bidimensional e o modo M foram obtidos em velocidade de varredura de 200mm ajustados de acordo com a frequência cardíaca. O fluxo da artéria pulmonar foi obtido por meio do Doppler pulsátil. As seguintes variáveis foram observadas: tempo de aceleração do fluxo na artéria pulmonar (TA) e seu tempo de ejeção (TE). Posteriormente, a razão TA/TE foi calculada. As imagens foram coletadas de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia e armazenadas para posterior análise [67].

2.5. Coleta de amostras

A eutanásia de todos os animais foi realizada quando houve manifestação de sinais clínicos de falha do VD (ex. perda de 10 g do peso corporal de um dia para outro e/ou dispneia; cianose; letargia) e os seus controles no mesmo dia, exceto para o grupo EM que teve a eutanásia realizada na média de sobrevivência do grupo SF. No dia em que os animais dos grupos EF e SF apresentaram os sinais clínicos de falha cardíaca, assim como seus respectivos controles (EC e SC), esses foram pesados e sofreram eutanásia por decapitação. Diferentemente, os animais do grupo EM sofreram eutanásia no 28º dia pós-injeção de MCT. Após eutanásia, o coração, os pulmões e os músculos gastrocnêmio direito e sóleo direito foram dissecados, pesados e processados para as análises de interesse, conforme descrito a seguir.

2.6. Conteúdo de água pulmonar

Para determinar se os ratos com HAP desenvolveram edema pulmonar, foi avaliado o teor de água no pulmão. O conteúdo hídrico dos órgãos foi obtido a partir dos seus pesos úmidos e secos. O peso úmido dos pulmões foi obtido em balança de alta precisão (BK 300, GEHAKA), logo após a remoção do órgão da cavidade torácica e dissecação dos tecidos. O pulmão esquerdo foi identificado, levado para uma estufa (NV 1.6, NEUONI) para desidratação a 80°C por 12 horas e novamente pesado para obtenção do peso seco [68]. Obtidos os pesos secos do pulmão, o teor de água (%H₂O) foi definido pela equação descrita anteriormente [69]:

$$\% \text{ H}_2\text{O} = (\text{Peso úmido} - \text{Peso seco}) / \text{Peso úmido} \times 100$$

2.7. Análises histológicas e morfométricas do gastrocnêmio

Análises histológicas e morfométricas do gastrocnêmio foram realizadas conforme descrito anteriormente [70]. Em suma, fragmentos de amostras do gastrocnêmio foram

colhidos, fixados em formalina a 10%, desidratados em etanol, clarificados em xilol e embebidos em parafina. Os blocos foram seccionados transversalmente em cortes histológicos de 5 µm de espessura, posteriormente corados com hematoxilina-eosina (H & E) e montados em lâminas histológicas. Para evitar análises repetidas da mesma área histológica, as seções foram avaliadas em semi-séries, usando uma de cada 10 seções. As lâminas foram visualizadas e as imagens capturadas usando um microscópio de luz (Olympus BX-50, Tóquio, Japão) conectado a uma câmera digital (Olympus Q Color-3, Tóquio, Japão). Posteriormente, foram realizadas as análises de percentual de fibra muscular. Para quantificação de matriz extracelular e fibra muscular, em cinco imagens aleatórias para cada animal, foi sobreposta uma grade com 130 intersecções. Foram contabilizadas as intersecções em fibra muscular e matriz extracelular e então calculada a porcentagem. Todas estas medidas foram realizadas utilizando-se o software Image-pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). As pranchas foram montadas com auxílio do programa GraphPad Prism 8.01.

2.8. Análises de biomarcadores de estresse oxidativo e metabolismo oxidativo

2.8.1. Análise da atividade da enzima citrato sintase

A atividade da citrato sintase foi avaliada no músculo sóleo (50 mg / mL em tampão Tris-HCl 0,1 M gelado, pH 7,4). A atividade da enzima foi determinada segundo um protocolo adaptado de [71], a partir da quantificação do complexo formado entre a CoA liberada com o DTNB do meio. A reação foi iniciada pela adição de oxaloacetato ao meio e a leitura realizada a 25°C, num intervalo de 10 minutos, em 412 nm.

2.8.2. Concentração de proteína carbonilada

A concentração de proteína carbonilada foi avaliada no músculo sóleo (50 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,1 M gelado, pH 7,4). A proteína carbonilada foi detectada espectrofotometricamente pela derivatização do grupo carbonila com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) [72, 73] e a absorvância foi normalizada pela quantificação da proteína por reagente Bradford®.

2.9. Análise de expressão gênica de biomarcadores de biogênese mitocondrial, inflamação e angiogênese.

A amostra do músculo gastrocnêmio direito e do pulmão direito (30 mg) foram homogeneizadas para isolar o RNA utilizando trizol (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil). A pureza do RNA (260/280nm) e as concentrações (ng/mL) foram determinadas na

espectrofotometria (NanoDrop 2000, *Thermo Scientific*, Rockford, IL, EUA) e a integridade foi avaliada eletroforéticamente por 1% gel de agarose marcado com *Nancy 520* (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil). Utilizando-se a técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR) para a quantificação dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) dos genes beta-actina (β -actina), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), receptor 2 do faotr de crescimento vascular endotelial (VEGFR-2), co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 α), endotelina 1 (ET-1), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 10 (IL-10). A transcrição reversa (cDNA) foi realizada com 2 μ g de RNA total adicionado aos seguintes reagentes: oligo dT (0.5 μ g), RiboLock™ RNase inhibitor (20U), 1mM de dNTP Mix, RevertAid™ Reverse Transcriptase (200U), totalizando uma solução com volume final de 20 μ l (Fermentas, Glen Burnie, MD, EUA). Em seguida, foi incubada por 60 minutos à 42°C mais 10 minutos à 70°C, finalizando a transcrição reversa. A expressão gênica foi analisada por qRT-PCR, utilizando-se primers (*Thermo Fisher Scientific*, EUA) desenhados (TABELA 1) e Power SYBR Green PCR (*Thermo Fisher Scientific*, EUA). A quantificação da fluorescência e análise da amplificação das bandas foram feitas pelo sistema de detecção de sequências ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Verificar ajuste de tabela

Tabela 1. Sequência dos primers para PCR em tempo real

	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
β -actina	AGCCATGTACGTAGCCAT	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA
VEGF	GTACCTCCACCATGCCAAGT	GCATTAGGGGCACACAGGAC
VEGF-R2	GTACCAAACCATGCTGGATTGC	CTTGCAGGAGATTTCCCAAGTG
PGC-1 α	ACCCACAGGATCAGAACAAACC	GACAAATGCTCTTTGCTTTATTGC
TNF- α	TGGGCTACGGGCTTGTCCTC	GGGGGCCACCACGCTCTTC
ET-1	CGGGGCTCTGTAGTCAATGTG	CCATGCAGAAAGGCGTAAAAG
IL-10	GAAGGACCAGCTGGACAACAT	CCTGGGGCATCACTTCTACC

Os resultados foram expressos usando-se o método de limiar comparativo de ciclos (Ct) como descrito pelo produtor do sistema. Os valores de delta Ct (DCt) foram calculados para cada amostra e gene de interesse, com Ct gene – Ct gene normalizador hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (Hprt). O cálculo das mudanças relativas no nível de expressão do gene de interesse (DDCt) foi realizado por subtração da média do DCt do grupo controle para o correspondente DCt de cada amostra dos demais grupos, seguindo de $2^{(-DDCt)}$. [74]. Para fins representativos, os valores do grupo WTC foram arbitrariamente definidos como 1. Nas correlações entre os resultados de expressão gênica e outras variáveis, utilizando os valores de $2^{(-DDCt)}$, para que assim seja excluído a correção pelo grupo controle (SC).

2.10. Análise estatística

A normalidade dos dados foi testada usando-se o teste Shapiro-Wilk. Os dados da sobrevivência foram comparados usando-se a análise da curva de Kaplan-Meier pelo teste Log-rank. Os dados da distância percorrida (nos dias representativos 1, 8, 15 e 22) foram comparados usando-se a análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas. Os dados de parâmetros celulares, bioquímicos, moleculares, peso corporal e peso de órgãos foram comparados usando-se ANOVA *one-way* ou Kruskal-Wallis, conforme normalidade de distribuição dos dados, seguidos de *post-hoc* apropriado para comparações múltiplas. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de média (DPM). O valor de $p < 0.05$ foi considerado para diferenças estatisticamente significantes. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism versão 8.0.2.

3. Resultados

3.1. Sobrevivência

A figura 1 apresenta os dados de sobrevivência dos animais dos grupos experimentais SF e EF. Embora todos os animais desses grupos tenham apresentado sinais de falha cardíaca, os animais do grupo EF apresentaram média de sobrevida maior (32 dias) do que os do grupo SF (28 dias; $p < 0,05$).

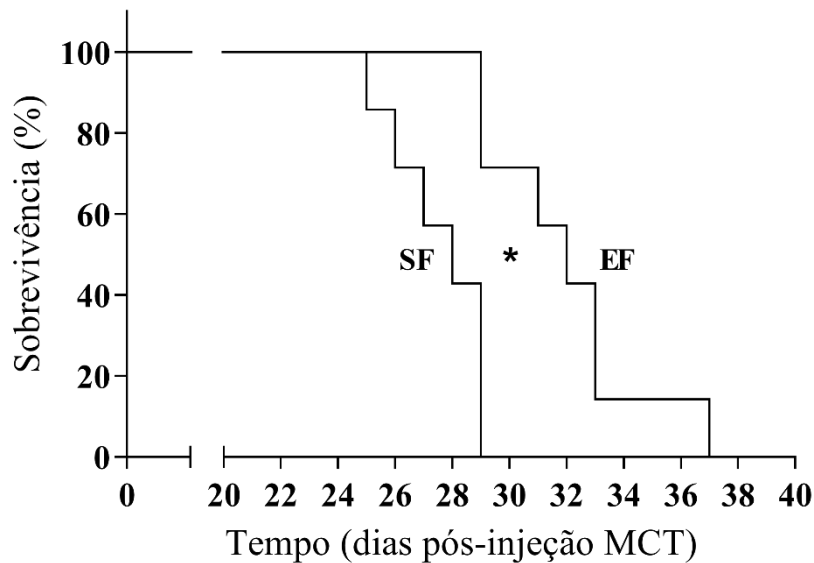


Figura 1. Sobrevivência medida nos dias de aparecimento dos sinais de falha cardíaca. SF, sedentário falha. EF, exercício falha. Curva *Kaplan-Meier*, com teste *post-hoc* de *Log-rank*. N = 8 ratos em cada grupo. * $P < 0,05$.

3.2. Tolerância ao esforço físico

Os animais dos grupos EC, EF e EM correram em média 2-3 km/dia, não havendo diferenças significativas entre as distâncias percorridas nos dias representativos (1, 8, 15 e 22). A distância percorrida diariamente pelos animais do grupo EF começou a cair 1-2 dias antes da observação dos sinais de falha cardíaca (Fig. 2A).

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

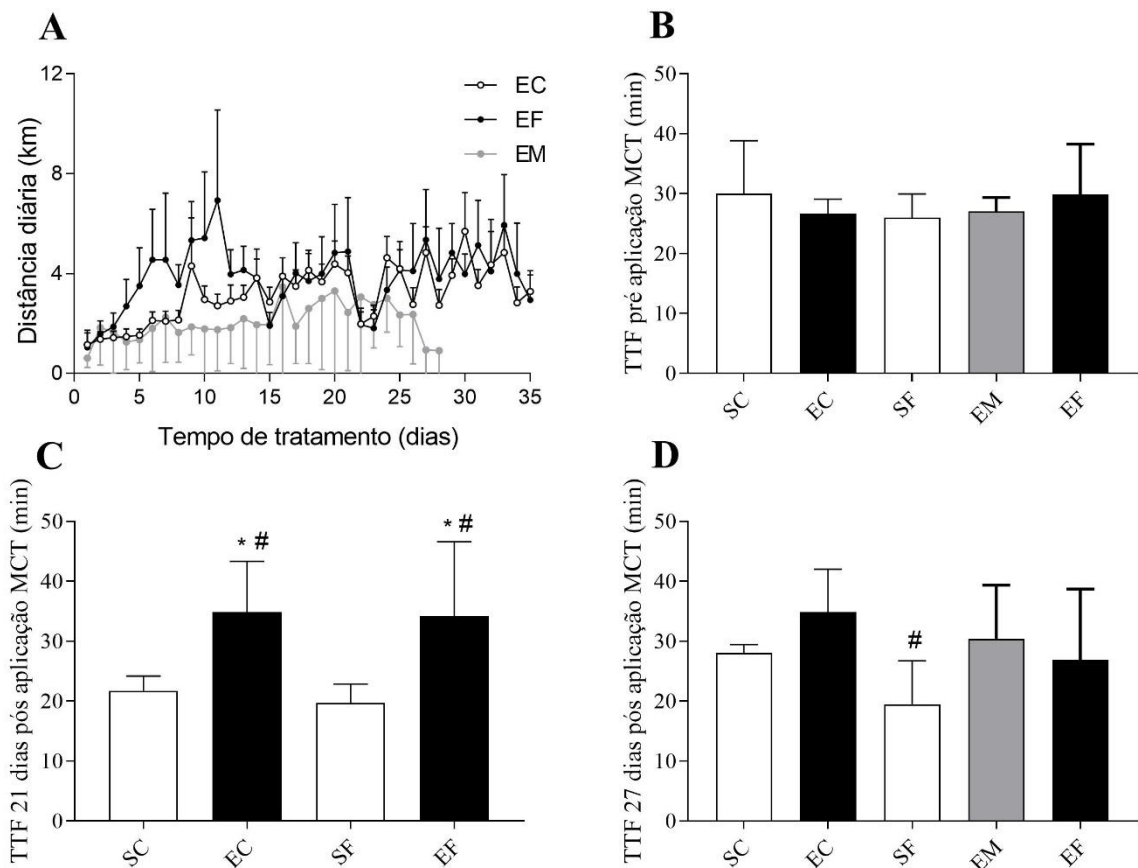


Figura 2. Tolerância ao exercício. (A) Distância percorrida. (B) Tempo total até a fadiga (TTF) medido antes da aplicação de monocrotalina (MCT); (C) TTF medido 21 dias após aplicação de MCT. (D) TTF medido 27 dias após aplicação de MCT. Dados são médias \pm DPM de 6 ratos em cada grupo. SC sedentário controle; EC, exercício controle; SF, sedentário com falha; EF, exercício com falha; EM, exercício média. ANOVA *One-way* de medidas repetidas para comparação dos dias 1, 8, 15, e 22 (Painel, A). ANOVA *One-way* para comparação entre os grupos (Painéis, B, C e D). * $P < 0,05$ vs. SC; # $P < 0,05$ vs. EC.

3.3. Resistência da artéria pulmonar

A figura 3 apresenta resultados do exame ecocardiográfico. No painel A, imagens representativas do fluxo da artéria pulmonar obtidas por meio de Doppler de onda pulsátil. Observa-se uma diminuição no TA/TE ($p < 0,05$) no grupo SF (falha cardíaca) comparados aos dos grupos SC e EC no 22º dia pós-injeção de MCT (Fig. 2B). No painel C, observa-se decréscimo significativo no TA/TE ($p < 0,05$) em animais do grupo SF e EF em comparação aos controles, SC e EC (25º dia pós-injeção de MCT). Entretanto, o grupo EM (27º dia pós-injeção de MCT) apresentou valores intermediários entre animais controle (SC e EC) e animais com falha (SF e EF).

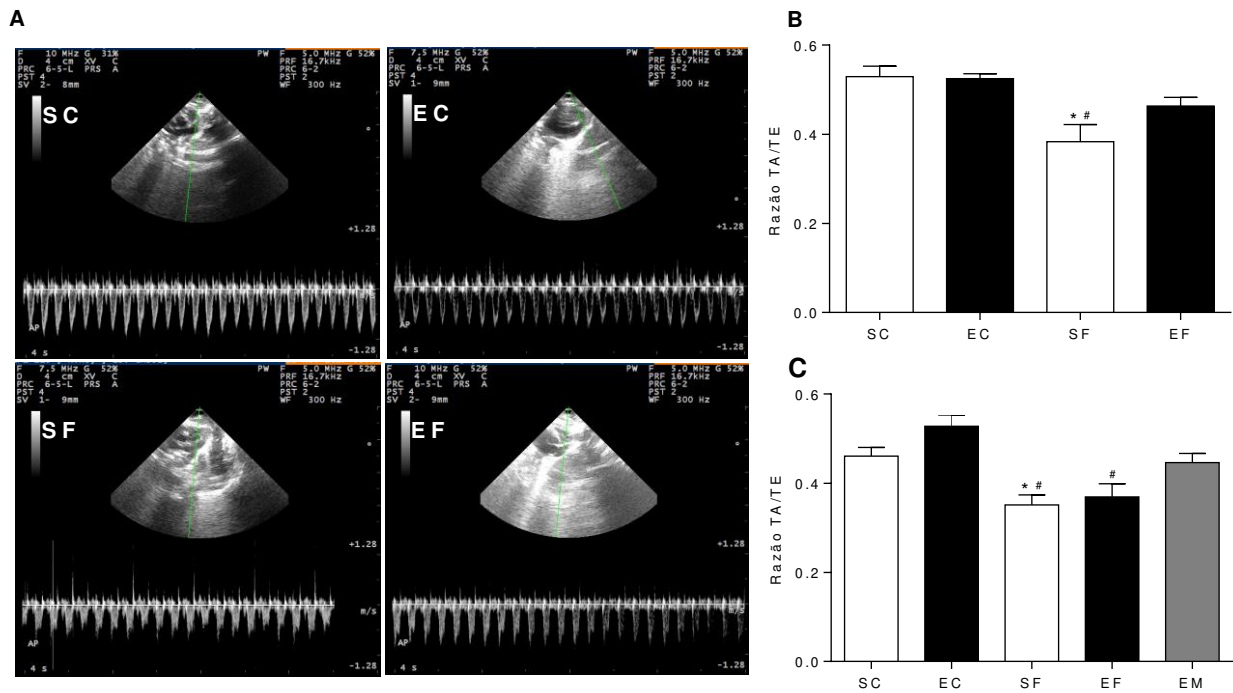


Figura 3. Dados ecocardiográficos. (A) Imagens representativas do fluxo da artéria pulmonar. (B) Relação tempo de aceleração/tempo de ejeção (TA/TE) medido 22 dias após injeção de MCT. (C) TA/TE medido 25 dias após injeção de MCT. SC, sedentário controle; EC, exercício controle; SF, sedentário com falha; EF, exercício com falha; EM, exercício média. Dados são médias \pm DPM de 6 ratos em cada grupo. ANOVA *One-way*. * $P < 0,05$ vs. SC; # $P < 0,05$ vs. EC.

3.4. Peso corporal e dos órgãos.

A tabela 1 apresenta os dados de peso corporal, peso dos órgãos e suas razões. O grupo SF apresentou menor peso corporal final quando comparado aos grupos SC e EM ($p < 0,05$). Animais dos grupos SF e EF apresentaram peso do coração, peso dos ventrículos, peso do ventrículo direito, razão peso dos ventrículos pelo peso corporal, peso do ventrículo direito pelo peso corporal, peso do ventrículo direito pelo peso do ventrículo esquerdo e peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal maiores do que os de seus controles ($p < 0,05$). O peso dos pulmões e a sua razão pelo peso corporal também foram maiores nos animais que apresentaram sinais de falha cardíaca (SF, EF) e no grupo EM quando comparados aos grupos SC e EC ($p < 0,05$). Por outro lado, na razão peso do ventrículo direito pelo peso corporal os animais do grupo EM que tiveram acesso à roda de corrida, mas sofreram eutanásia antes de apresentarem os sinais de falha cardíaca, apresentaram valores intermediários entre os grupos controles (SC e EC) e os com falha cardíaca (SF e EF).

Tabela 2. Peso corporal, dos órgãos e razões.

	SC	EC	SF	EM	EF
PC inicial, g	220,3 ± 25,41	235,7 ± 17,50	217,6 ± 16,64	240,4 ± 33,51	224,3 ± 26,10
PC final, g	321,8 ± 39,91	303,7 ± 34,52	262,8 ± 37,32*	323,2 ± 32,00 ^{&}	296,7 ± 27,38
PCor, g	1,25 ± 0,05	1,18 ± 0,04	1,46 ± 0,05 [#]	1,40 ± 0,06 [#]	1,54 ± 0,05 ^{*#}
PV, g	1,29 ± 0,06	1,22 ± 0,09	1,57 ± 0,10	1,52 ± 0,05	1,74 ± 0,14 ^{*#}
PVD, g	0,25 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,39 ± 0,02*	0,40 ± 0,03*	0,50 ± 0,04 ^{*#}
PVE, g	0,89 ± 0,03	0,93 ± 0,07	0,92 ± 0,07	1,08 ± 0,03	0,98 ± 0,05
PP, g	1,68 ± 0,86	1,69 ± 0,19	2,88 ± 0,72 ^{*#}	3,01 ± 0,50 ^{*#}	3,62 ± 0,73 ^{*#}
% H ₂ O do pulmão	81,76 ± 1,36	80,46 ± 1,16	81,03 ± 1,36	80,93 ± 3,1	79,82 ± 1,18
PG, g	1,70 ± 0,19	1,92 ± 0,11	1,54 ± 0,19	1,84 ± 0,19	1,61 ± 0,19
PS, g	0,133 ± 0,02	0,137 ± 0,02	0,104 ± 0,72	0,140 ± 0,50	0,128 ± 0,02
PV : PC, mg/g	4,15 ± 0,15	3,87 ± 0,24	05,89 ± 0,31 ^{*#}	5,22 ± 0,21 [#]	6,27 ± 0,49 ^{*#}
PVD : PC, mg/g	0,80 ± 0,03	0,95 ± 0,08	1,49 ± 0,12 ^{*#}	0,138 ± 0,09 ^{*#}	0,182 ± 0,11 ^{*#}
PVD : PVE, mg/mg	0,27 ± 0,01	0,32 ± 0,03	0,43 ± 0,03*	0,37 ± 0,03	0,51 ± 0,03 ^{*#}
PVE : PC, mg/g	2,89 ± 0,06	2,94 ± 0,19	3,45 ± 0,14*	3,72 ± 0,15 ^{*#}	3,55 ± 0,17*
PP : PC, mg/g	5,41 ± 0,89	5,03 ± 0,45	10,61 ± 2,13 ^{*#}	9,74 ± 1,95 ^{*#}	10,51 ± 2,07 ^{*#}
PG : PC mg/g	5,37 ± 0,24	5,73 ± 0,24	5,91 ± 0,24	5,91 ± 0,36	5,46 ± 0,47
PS ; PC mg/g	0,42 ± 0,2	0,41 ± 0,08	0,40 ± 0,06	0,44 ± 0,06	0,43 ± 0,08

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

3.5. Histomorfometria do Gastrocnêmio

A figura 4 apresenta resultados histomorfométricos do gastrocnêmio. Observa-se que animais dos grupos SF, EF e EM apresentaram um menor percentual de fibra muscular e por sua vez um maior percentual de matriz extracelular em relação aos grupos SC, EC ($p < 0,01$) (Fig. 4). Contudo, os animais dos grupos EM e EF apresentaram um maior percentual de fibra muscular em relação ao grupo SF ($p < 0,05$) (Fig. 4).

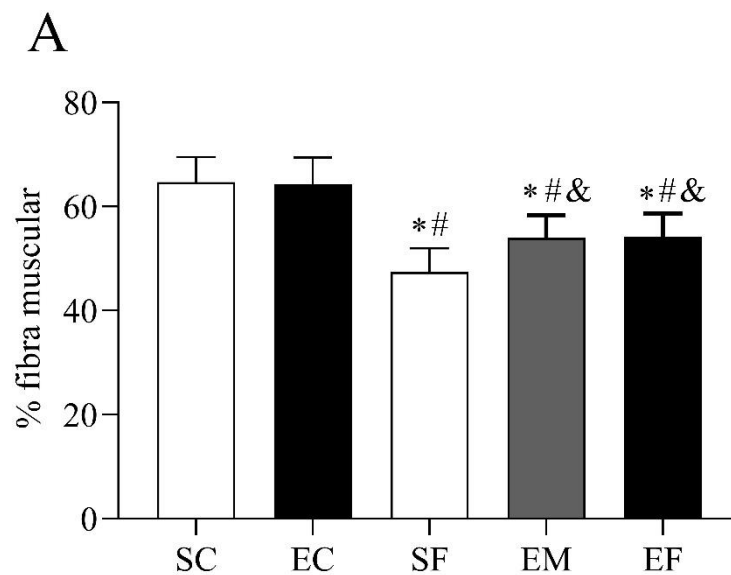


Figura 4. Parâmetros histológicos do músculo gastrocnêmio. (A) Porcentagem de fibra muscular. Dados em médias \pm DPM de 8 imagens por animal em cada grupo ($n=6$ ratos em cada grupo). SC, sedentário controle; EC, exercício controle; SF, sedentário com falha; EF, exercício com falha; EM, exercício média. *Kruskal-Wallis* com *post hoc* de *Dunn*. * $P < 0,05$ vs. SC; # $P < 0,05$ vs. EC; & $P < 0,05$ vs. SF

3.6. Biomarcadores de inflamação

A figura 5 apresenta a razão da expressão gênica entre TNF- α e IL-10 no músculo gastrocnêmio e no pulmão como referência para estado inflamatório. Em relação ao estado inflamatório do músculo, o grupo EF apresentou um maior estado de inflamação quando comparado ao grupo EC ($p < 0,05$) (Fig. 5A). Já se tratando do tecido pulmonar, os animais do grupo EM apresentaram um maior estado inflamatório em relação aos animais do grupo SC, EC, SF e EF ($p > 0,05$) (Fig. 5B).

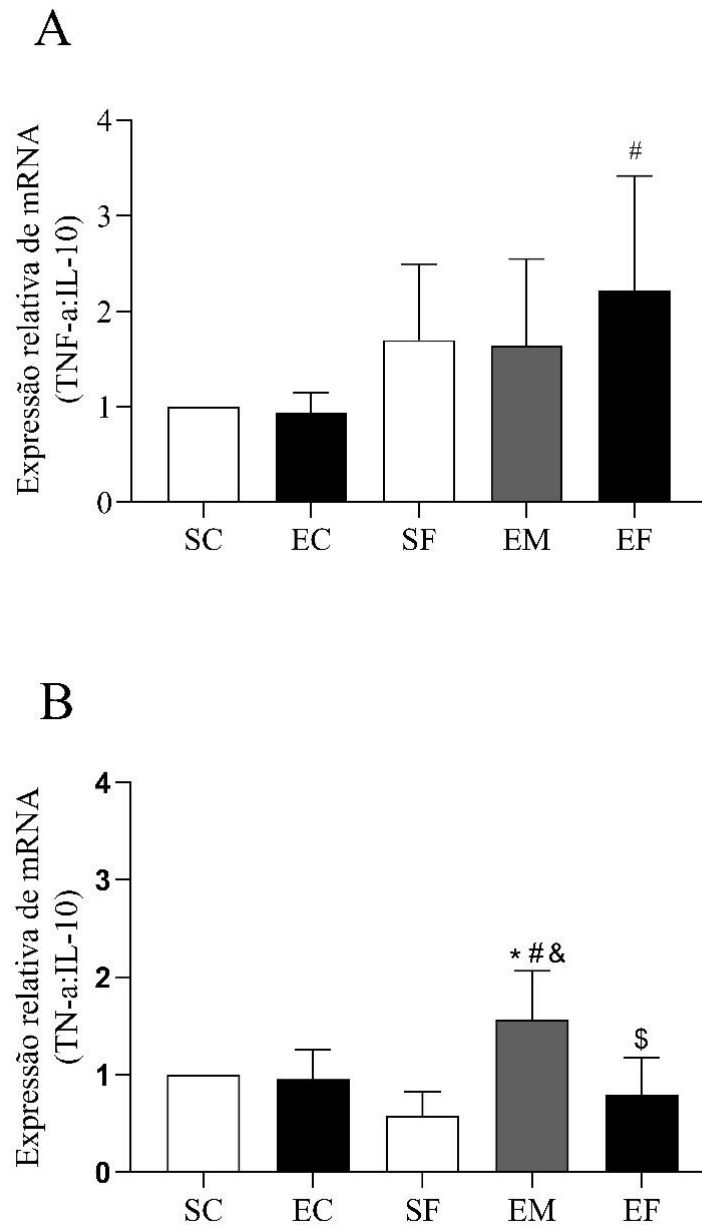


Figura 5. Expressão relativa da razão de mRNA de TNF- α :IL-10. (A) TNF- α /IL-10 no músculo; (B) TNF- α /IL-10 no pulmão. Dados em médias \pm DPM de 7 animais por grupo. SC, sedentário controle; EC, exercício controle; SF, sedentário com falha; EF, exercício com falha; EM, exercício média. ANOVA *One-way* com *post hoc* de Tukey. * P <0.05 vs. SC; # P <0.05 vs. EC; & P <0.05 vs. SF; $^{\$}$ P <0.05 vs. EM.

3.7. Biomarcadores de biogênese mitocondrial e metabolismo oxidativo

A figura 6 apresenta a razão da expressão gênica de PGC1- α e atividade da enzima citrato sintase. A expressão gênica de PGC1- α dos grupos SF e EM foi menor em relação ao

grupo SC ($p < 0,05$) (Fig. 6A). O grupo EF apresentou maior expressão do gene PGC1- α em relação ao seu controle EC ($p < 0,05$) (Fig. 6A). Contudo, não se observou diferença entre os grupos com relação a atividade da enzima citrato sintase ($p > 0,05$) (Fig. 6B).

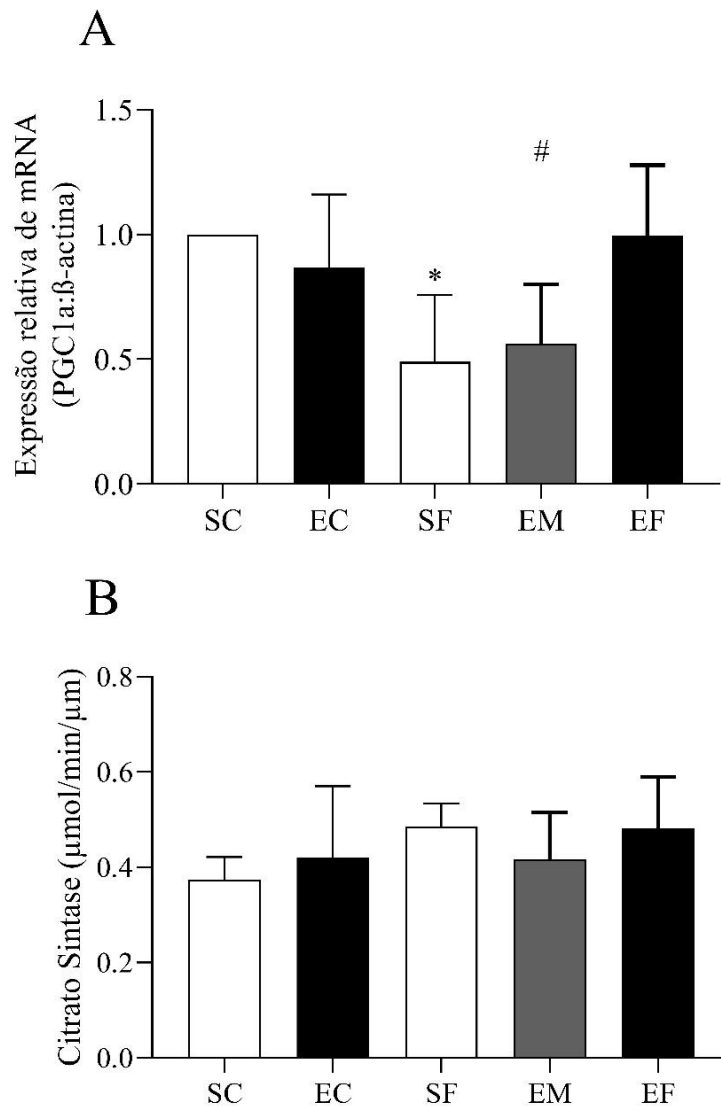


Figura 6. Expressão relativa de mRNA de PGC1- α no gastrocnêmio e atividade da citrato sintase no sóleo. (A) PGC1- α . (B) Atividade da cintrato sintase. Dados em médias \pm DPM de 6 animais por grupo. SC, sedentário controle; EC, exercício controle; SF, sedentário com falha; EF, exercício com falha; EM, exercício média. ANOVA *One-way* com *post hoc* de *Tukey*. * $P < 0,05$ vs. SC; # $P < 0,05$ vs. EC.

3.8. Biomarcadores de angiogênese

A figura 7 apresenta a expressão gênica de VEGF e VEGFR-2 no músculo gastrocnêmio e no pulmão. Os grupos SF e EM apresentaram uma maior expressão gênica de VEGF em comparação ao grupo SC ($p < 0,05$) (Fig. 7A) no gastrocnêmio. Já na expressão do VEGFR-2 no músculo não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$) (Fig. 7B). No tecido pulmonar, a expressão gênica do VEGF e do VEGFR2 não apresentou diferença entre os grupos ($p > 0,05$) (Fig. 7C e 7D).

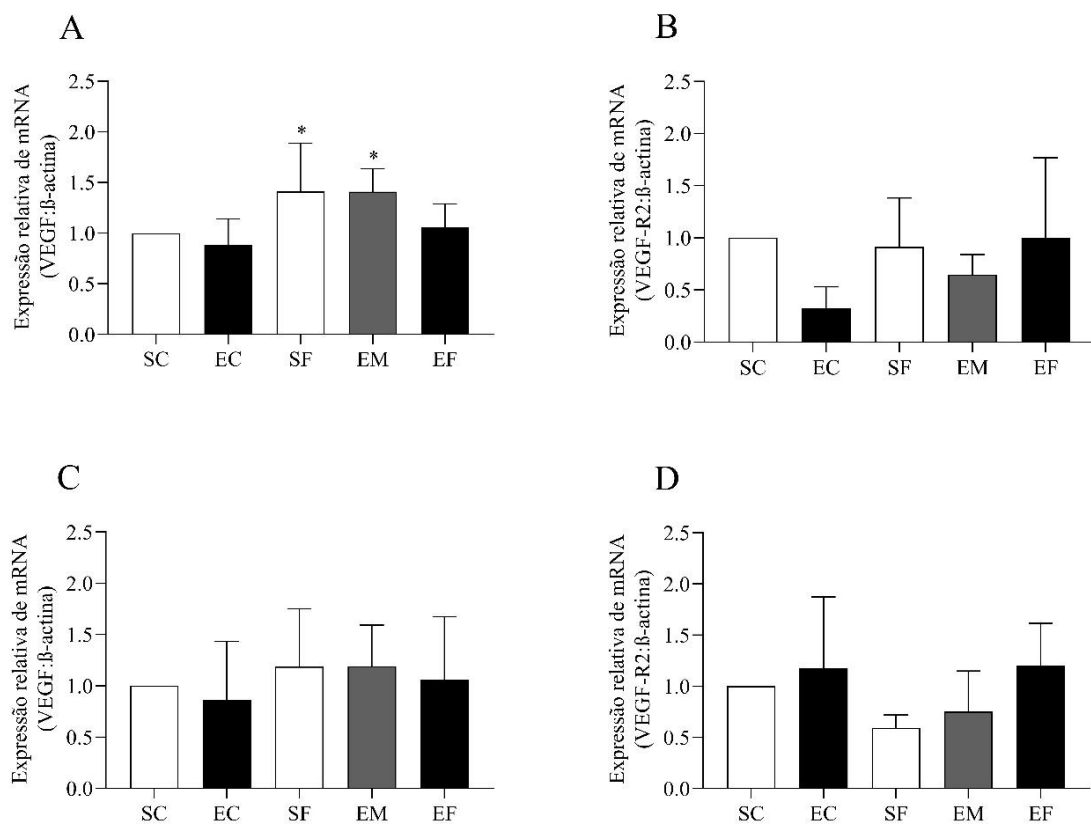


Figura 7. Expressão relativa de mRNA de VEGF e VEGFR-2. (A) VEGF no gastrocnêmio. (B) VEGFR-2 no gastrocnêmio. (C) VEGF no pulmão. (D) VEGFR2 no pulmão. Dados em médias \pm DPM de 7 animais por grupo. SC, sedentário controle; EC, exercício controle; SF, sedentário com falha; EF, exercício com falha; EM, exercício média. ANOVA *One-way* com *post hoc* de Tukey. * $P < 0,05$ vs. SC.

3.8. Biomarcador de vasoconstrição

A figura 8 apresenta a expressão gênica de endotelina no pulmão. Os grupos EC e SF apresentaram uma menor expressão gênica de endotelina em comparação ao grupo SC ($p < 0,01$) (Fig. 8A). Já os animais do grupo EF apresentaram uma maior expressão de endotelina em comparação aos animais dos grupos EC e SF ($p < 0,05$) (Fig. 8A).

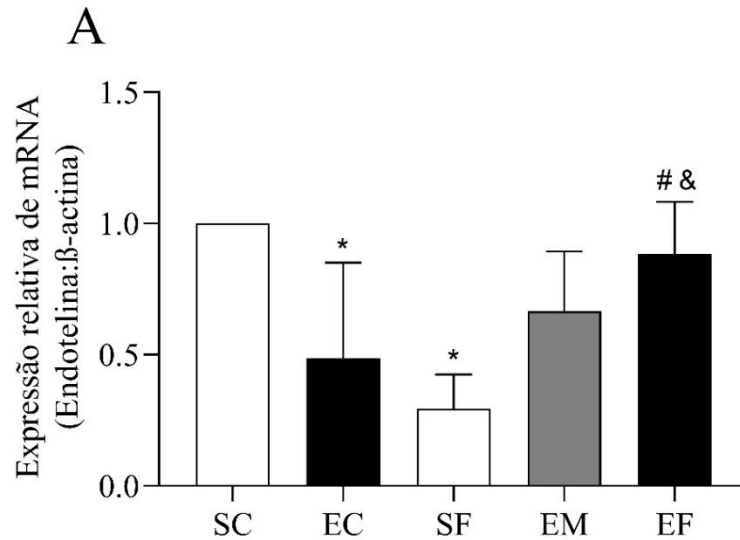


Figura 8. Expressão relativa de mRNA de Endotelina-1 no pulmão. (A) Endotelina-1. Dados em médias \pm DPM de 7 animais por grupo. SC, sedentário controle; EC, exercício controle; SF, sedentário com falha; EF, exercício com falha; EM, exercício média. ANOVA *One-way* com *post hoc* de Tukey. * $P < 0,05$ vs. SC; # $P < 0,05$ vs. EC; & $P < 0,05$ vs. SF.

3.9. Biomarcador de estresse oxidativo

A figura 9 apresenta a concentração de proteína carbonilada no músculo sóleo. Não se observou diferença entre os grupos com relação à concentração de proteína carbonilada ($p > 0,05$) (Fig. 8A).

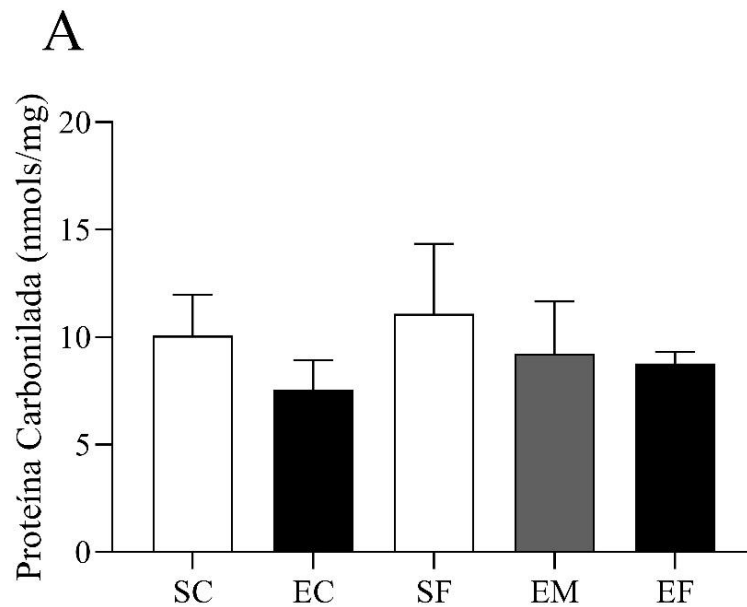


Figura 9. Concentração de proteína carbonilada no sóleo. (A) Proteína Carbonilada. Dados em médias \pm DPM de 6 animais por grupo. SC, sedentário controle; EC, exercício controle; SF, sedentário com falha; EF, exercício com falha; EM, exercício média. Kruskal-Wallis.

4. Discussão

No presente estudo foi analisado o efeito do treinamento em corrida voluntária, realizado durante a fase de desenvolvimento da HAP, sobre a sobrevivência, a tolerância ao esforço físico, a estrutura do ME, a biogênese mitocondrial do ME, o metabolismo oxidativo do ME, o estado inflamatório do ME e dos pulmões e a função endotelial do ME e dos pulmões de ratos com HAP induzida por MCT. Observou-se que a corrida voluntária foi capaz de aumentar a sobrevivência dos animais, a tolerância ao esforço, retardar a progressão da resistência da artéria pulmonar e o remodelamento do ME. Além disso, o treinamento foi capaz de aumentar a biogênese mitocondrial no ME.

4.1. Sobrevivência, tolerância ao esforço físico e morfometria do ME

No presente estudo a corrida voluntária foi capaz de aumentar a tolerância ao esforço dos animais com HAP (EF e EM). Os resultados mostram ainda que a corrida voluntária foi capaz de aumentar a sobrevivência dos animais com HAP, corroborando com estudos anteriores do nosso grupo [55, 59]. Vários fatores podem ter contribuído para o aumento da sobrevivência

desses animais, dentre eles a melhora na estrutura [54, 59] e na função do miocárdio [55, 59], favorecendo o débito cardíaco.

A locomoção é uma característica clássica da vida animal, em quase todas as espécies de mamífero constitui um elemento importante da vida cotidiana para procurar comida, abrigo e parceiros, competir com concorrentes e evitar predadores. E por isso, a locomoção pode ser considerada obrigatória. No ser humano a motivação para o exercício voluntário é multifatorial e muito complexa [75]. Já nos roedores de laboratório ela é mais simples e pode estar relacionada a traços de comportamento do animal [76]. A corrida voluntária em roda é claramente recompensadora para os roedores, então se torna um comportamento auto-motivado clássico [77]. Desta forma, o desempenho dos animais pode ser extraordinário, chegando a correr 16 quilômetros em 24 horas [78]. Neste estudo, os animais chegaram a correr aproximadamente 8 km/24h a uma velocidade de 35 m/min (alta intensidade) em um exercício que pode ser caracterizado como intermitente, intercalando os períodos de descanso com períodos de corrida.

Apesar das terapias farmacológicas possuírem bons resultados no tratamento da HAP, elas não aumentam a tolerância ao exercício, o que diminui consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes. Os resultados deste estudo mostram o aumento da tolerância ao esforço nos animais dos grupos treinados (grupos EF e EM). Isto pode ser explicado, ao menos em parte, pelo fato do treinamento (grupos EF e EM) ter impedido a diminuição do percentual de fibras musculares e por consequência impedido o aumento da matriz extracelular no gastrocnêmio em relação aos animais doentes sedentários (grupo SF), o que pode ter auxiliado na manutenção da estrutura e função muscular esquelética. Segundo Agarwal e colaboradores (2009), o efeito antifibrótico do exercício físico pode estar relacionado às suas propriedades anti-inflamatórias, um vez que o exercício reduz a quantidade de citocinas pró-inflamatórias que induzem a proteólise do músculo esquelético [79]. Este fato não foi observado neste estudo. O aumento do percentual de fibra muscular observado nos animais doentes que se exercitaram (EF e EM) em comparação aos animais doentes sedentários (SF) neste estudo corroboram os resultados observados em estudo prévio [54], que mostra que um treinamento de corrida em esteira, tanto antes, quanto após a aplicação de MCT, foi capaz de aumentar a área de secção transversa do músculo gastrocnêmio e reduzir a quantidade de matriz extracelular, melhorando, assim, a tolerância ao esforço. Além disso, estudos anteriores observaram que o treinamento físico foi capaz de melhorar estrutura e função cardíaca [54, 55], reatividade vascular pulmonar [80] e a eficácia na troca gasosa pulmonar [81], prevenindo a hipoxemia. Todos esses

fatores também podem ter contribuído para o aumento da tolerância ao esforço físico observado no presente estudo.

4.2. Hemodinâmica/Resistência da artéria pulmonar

A partir dos resultados do exame ecocardiográfico realizado 22 dias após aplicação de MCT, é possível observar que o grupo SF apresentou aumento na resistência da artéria pulmonar, estimada pela diminuição da razão TA/TE, em relação ao grupo SC. Todavia, no exame realizado 25 dias após aplicação de MCT, foi observado que além do grupo SF, o grupo EF apresentava um aumento na resistência da artéria pulmonar. Aumento este, que é característica fundamental do modelo de HAP utilizado, pois este aumento é fator crucial para o remodelamento patológico do VD [7]. O aumento da resistência vascular na HAP tem sido associado a uma perturbação entre fatores vasoconstritores e vasodilatadores endoteliais. O óxido nítrico sintase endotelial, a óxido nítrico sintase, enzima responsável pela produção do óxido nítrico e os níveis de prostanoídes são fatores endoteliais vasodilatadores que estão diminuídos na HAP. Somado a isso, a endotelina-1 e tromboxano que são fatores vasoconstritores e contribuem para enrijecimento e remodelação vascular estão aumentados [82].

Contudo, a corrida voluntária foi capaz de retardar a diminuição da razão TA/TE nos animais do grupo EM indicando benefício do treinamento, o que está de acordo com estudos prévios em modelos de HAP induzida por MCT [52, 83]. O aumento da biodisponibilidade do ON é um efeito vascular importante gerado pelo exercício físico em função do aumento do estresse por cisalhamento [84]. Um estudo prévio demonstrou que o treinamento intervalado de alta intensidade contribui para prevenção do remodelamento arterial patológico em modelo de HAP [52]. Assim sendo, acredita-se que os benefícios do exercício de corrida voluntária sobre a razão TA/TE podem estar relacionados à maior síntese de ON na circulação pulmonar. O atraso no remodelamento arterial patológico provocado pelo exercício é fundamental para a redução da sobrecarga e do remodelamento patológico do VD, ajudando na manutenção da função cardíaca [7].

4.3. Peso corporal e dos órgãos.

Os pesos do gastrocnêmio e também do sóleo não foram alterados pela HAP (grupos SF, EF e EM). Este achado conflita com estudos anteriores em modelo animal com aplicação de MCT que mostraram diminuição do peso do gastrocnêmio causados pela HAP [54, 60].

Entretanto, este resultado corrobora com o achado observado em estudo com mesma dosagem de aplicação de MCT (60mg/kg) [42], onde o peso do músculo plantar não alterou entre os grupos. Uma possível explicação é de que as fibras musculares tipo II (glicolíticas), são mais afetadas pelos efeitos deletérios da HAP [42], em comparação com fibras do tipo I (oxidativas). O mesmo acontece na falha cardíaca esquerda [85]. Este fato ocorre porque as fibras musculares glicolíticas são mais susceptíveis ao estresse oxidativo e conseqüentemente ao sistema ubiquitina-proteassoma [85]. O músculo sóleo é conhecidamente um músculo com perfil predominantemente oxidativo e o gastrocnêmio possui um perfil misto entre fibras glicolíticas e oxidativas. Este fato pode ter sido determinante para que não houvesse mudança no peso dos músculos esqueléticos analisados neste estudo.

As razões do peso do VD e VE pelo peso corporal e também a razão do peso do pulmão pelo peso corporal, foram maiores nos grupos SF e EF quando comparados ao grupo SC, evidenciando os prejuízos causados pela HAP. De fato, a resposta hipertrófica à sobrecarga de pressão é considerada um mecanismo compensatório para normalizar o estresse elevado, o que em longo prazo está associado à deposição de colágeno na matriz extracelular, apoptose e fibrose no miocárdio [7, 86]. Entretanto, o exercício voluntário retardou a progressão do remodelamento cardíaco em ratos com HAP induzida por MCT (grupo EM), conforme demonstrado em estudo prévio [55]. Já é de conhecimento que o exercício físico minimiza a RVP e desta forma a hipertrofia do VD gerada pelo aumento da pós-carga em modelo de HAP induzida por MCT [54]. Realmente, observou-se neste estudo que o treinamento em corrida voluntária reduziu a resistência da artéria pulmonar (TA/TE), resultando assim na diminuição da sobrecarga de pressão no VD.

4.4. Estado inflamatório

No presente estudo foi avaliado o estado inflamatório do ME e do pulmão através da razão TNF- α /IL-10. A relação entre duas citocinas já foi realizada antes para verificação do estado inflamatório após aplicação de MCT, porém no VD [54]. O TNF- α é uma citocina, produzida principalmente por macrófagos, mas também é produzida por outras células musculares induzindo várias respostas celulares, como apoptose, proliferação e produção de moléculas inflamatórias [34]. O TNF- α foi a primeira citocina reconhecida por possuir um papel direto na resistência à insulina. TNF- α diminui a fosforilação da tirosina [87, 88] e aumenta a fosforilação de serina [31] no substrato do receptor de insulina (IRS-1). Este aumento relativo da fosforilação de serina em relação à tirosina pode levar ao aumento da degradação proteica

do IRS-1, levando à diminuição no restante da sinalização metabólica da insulina. Já a IL-10 é conhecida por seu efeito anti-inflamatório, protegendo as fibras musculares esqueléticas das ações do TNF- α e IL-6 no metabolismo da insulina. Os resultados do presente estudo mostram que só houve um aumento no estado inflamatório no grupo com HAP que realizou corrida voluntária (grupo EF). Foi um resultado inesperado visto que estudos anteriores mostraram que a HAP aumentava o estado inflamatório do ME sem treinamento físico [28, 29, 54], e que o treinamento diminuiu o estado inflamatório em outros tecidos como o VD [54]. Portanto a corrida voluntária não foi capaz de reduzir o estado inflamatório do ME. Um resultado inesperado também foi encontrado no estado inflamatório do pulmão, em que os animais do grupo EM apresentaram um maior estado inflamatório em relação aos demais.

4.5 Biogênese mitocondrial, metabolismo oxidativo e estresse oxidativo

A diminuição da expressão gênica de PGC1- α no musculo gastrocnêmio observada neste estudo nos grupos SF e EM corrobora com estudo prévio em modelo com aplicação de MCT [41], onde os animais que receberam a injeção de MCT já começavam a apresentar a diminuição na expressão desse gene a partir de duas semanas após a aplicação. O PGC1- α é uma proteína co-ativadora que se liga a vários fatores de transcrição, levando ao aumento da expressão de genes envolvidos na biogênese mitocondrial e aumento da função respiratória [89]. A corrida voluntária foi capaz de aumentar a expressão de mRNA de PGC1- α nos animais que sofreram eutanásia ao apresentarem sinais de falha cardíaca (grupo EF), entretanto nos animais do grupo EM a corrida voluntária não teve o mesmo efeito. A chegada de oxigênio na musculatura ativa pode ser prejudicada em animais com falha cardíaca causada pela HAP [11]. Este fato pode explicar o aumento da expressão de PGC1- α nos animais do grupo EF e o mesmo não ter ocorrido no grupo EM, uma vez que os animais do grupo EF estavam em um estágio mais crítico da doença.

Não foram observadas diferenças no metabolismo oxidativo que pode ser representado pela atividade da enzima citrato sintase no sóleo entre os grupos. Resultado esse que conflita com estudo prévio que mostra uma diminuição na atividade da enzima causada pela HAP [41]. A enzima citrato sintase é um importante enzima do ciclo de Krebs, pois catalisa a entrada de carbono neste ciclo [90]. Uma possível explicação para o fato de a HAP não ter alterado a atividade da citrato sintase é devido à grande quantidade de fibras vermelhas (aproximadamente 95%) que o sóleo possui [90]. Isso porque fibras musculares glicolíticas sofrem mais os efeitos deletérios da HAP [42]. Este fato também pode explicar os resultados de proteína carbonilada

que mostram que não houve diferença entre os grupos, e por sua característica o músculo sóleo é menos susceptível ao estresse oxidativo [42]. Por outro lado, é conhecido que o exercício físico aeróbico aumenta a atividade da citrato sintase no músculo sóleo [90], o que não ocorreu neste estudo. Uma possível explicação seria o fato de que o exercício de corrida voluntária possui características de exercício anaeróbico [78], intermitente e de alta intensidade, e dessa não gerando as adaptações esperadas de um exercício aeróbico. Além disso o tempo de treinamento foi relativamente curto, e isso também pode explicar o não aumento da atividade da enzima citrato sintase.

4.5 Angiogênese

Os animais dos grupos SF e EM apresentaram maior expressão gênica de VEGF no ME quando foram comparados com os animais do grupo SC. Já no pulmão não houve diferença entre os grupos. O VEGF representa uma família de glicoproteínas fundamentais para o desenvolvimento embrionário do sistema vascular sanguíneo (vasculogênese), do sistema linfático (linfangiogênese) e na formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes [91]. Estudo prévio mostra que a microcirculação do ME de pessoas com HAP parece estar prejudicada, evidenciado pela baixa saturação de O₂ do tecido [37]. Portanto, o aumento de mRNA de VEGF no gastrocnêmio dos animais dos grupos SF e EM parece ser um mecanismo de compensatório para evitar maiores prejuízos para a falta de O₂ no músculo. O resultado da expressão gênica de VEGF no pulmão não corrobora com estudo anterior onde um treinamento de corrida em esteira de 3 semanas após a aplicação de MCT foi capaz de aumentar a expressão de RNAm de VEGF, sugerindo que o treinamento físico foi capaz de aumentar a angiogênese pulmonar [92].

Não houve diferenças na expressão gênica de VEGFR-2 no músculo gastrocnêmio e nem no pulmão. A família VEGF possui três receptores específicos, o VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3, sendo o VEGFR-2 o responsável pelo desenvolvimento das células endoteliais [91]. Uma possível explicação para o resultado encontrado nos pulmões é o fato de não ter havido aumento da expressão do RNAm do VEGF no tecido e da mesma forma do seu receptor.

4.6 Endotelina-1

Surpreendentemente a HAP causou uma diminuição da expressão gênica da endotelina-1 (grupo SF) e a corrida voluntária aumentou a expressão desse gene (grupo EF). A endotelina-1 é um importante vasoconstritor e estimula a proliferação de células musculares lisas. Este

resultado conflita com estudos anteriores que mostram benefícios do treinamento físico para a vasculatura pulmonar, principalmente pelo aumento da eNOS e por consequência do ON, favorecendo a vasodilatação de arteríolas pulmonares [62]. Entretanto, este resultado corrobora com o estudo de Handoko e colaboradores em que o treinamento físico causou um piora significativa para o tecido pulmonar, apresentado um aumento na espessura da parede de arteríolas pulmonares além de causar um aumento no conteúdo de água no pulmão que os autores relacionaram com edema pulmonar [53].

5. Conclusões

Concluiu-se que o treinamento em corrida voluntária foi capaz aumentar a sobrevivência dos animais, aumentar a tolerância ao esforço, retardar o aumento da resistência da artéria pulmonar, aumentar o percentual de fibra muscular, aumenta o indicador de biogênese mitocondrial no ME com HAP induzida por MCT. Estas contribuições indicam influência positiva do exercício físico voluntário para retardar o desenvolvimento da falha cardíaca e aumento na tolerância ao esforço físico nestes animais. Estes achados proporcionam um melhor entendimento sobre as contribuições do exercício físico para a saúde do músculo esquelético e do pulmão de pacientes com HAP que podem levar a uma melhor qualidade de vida.

6. Referências Bibliográficas

1. Hoeper, M.M., et al., *Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(25 Suppl): p. D42-50.
2. Hoeper, M.M., et al., *A global view of pulmonary hypertension*. Lancet Respir Med, 2016. **4**(4): p. 306-22.
3. Lai, Y.C., et al., *Pulmonary arterial hypertension: the clinical syndrome*. Circ Res, 2014. **115**(1): p. 115-30.
4. Wilkins, M.R., et al., *Recent advances in pulmonary arterial hypertension*. F1000Res, 2018. **7**.
5. 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*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(17): p. 1573-619.
6. Sandoval, J., *Interventional Therapies in Pulmonary Hypertension*. Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2018. **71**(7): p. 565-574.
7. Ryan, J.J. and S.L. Archer, *The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure*. Circ Res, 2014. **115**(1): p. 176-88.
8. Ryan, J.J., et al., *Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension*. Can J Cardiol, 2015. **31**(4): p. 391-406.
9. Voelkel, N.F., et al., *Right ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure*. Circulation, 2006. **114**(17): p. 1883-91.
10. Colvin, K.L. and M.E. Yeager, *Animal Models of Pulmonary Hypertension: Matching Disease Mechanisms to Etiology of the Human Disease*. J Pulm Respir Med, 2014. **4**(4).
11. Marra, A.M., et al., *Pulmonary arterial hypertension-related myopathy: an overview of current data and future perspectives*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2015. **25**(2): p. 131-9.
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. Batt, J., et al., *Skeletal muscle dysfunction in idiopathic pulmonary arterial hypertension*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014. **50**(1): p. 74-86.
14. Bauer, R., et al., *Skeletal muscle dysfunction in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension*. Respir Med, 2007. **101**(11): p. 2366-9.
15. Mainguy, V., et al., *Peripheral muscle dysfunction in idiopathic pulmonary arterial hypertension*. Thorax, 2010. **65**(2): p. 113-7.
16. Kabitz, H.J., et al., *The combination of exercise and respiratory training improves respiratory muscle function in pulmonary hypertension*. Lung, 2014. **192**(2): p. 321-8.
17. Meyer, F.J., et al., *Respiratory muscle dysfunction in idiopathic pulmonary arterial hypertension*. Eur Respir J, 2005. **25**(1): p. 125-30.
18. Nogueira-Ferreira, R., et al., *Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach*. Pulm Pharmacol Ther, 2015. **35**: p. 8-16.
19. Stenmark, K.R., et al., *Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009. **297**(6): p. L1013-32.

20. Sztuka, K. and M. Jasinska-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.
21. 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.
22. Lalich, J.J. and L. Merkow, *Pulmonary arteritis produced in rat by feeding Crotalaria spectabilis*. Lab Invest, 1961. **10**: p. 744-50.
23. Barman, S.A., S. Zhu, and R.E. White, *RhoA/Rho-kinase signaling: a therapeutic target in pulmonary hypertension*. Vasc Health Risk Manag, 2009. **5**: p. 663-71.
24. Campian, M.E., et al., *How valid are animal models to evaluate treatments for pulmonary hypertension?* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2006. **373**(6): p. 391-400.
25. 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.
26. Schultze, A.E. and R.A. Roth, *Chronic pulmonary hypertension--the monocrotaline model and involvement of the hemostatic system*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 1998. **1**(4): p. 271-346.
27. Huxtable, R.J., et al., *Physicochemical and metabolic basis for the differing neurotoxicity of the pyrrolizidine alkaloids, trichodesmine and monocrotaline*. Neurochem Res, 1996. **21**(2): p. 141-6.
28. Hassoun, P.M., et al., *Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(1 Suppl): p. S10-9.
29. Soon, E., et al., *Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension*. Circulation, 2010. **122**(9): p. 920-7.
30. Odegaard, J.I. and A. Chawla, *Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis*. Science, 2013. **339**(6116): p. 172-7.
31. Bouzakri, K. and J.R. Zierath, *MAP4K4 gene silencing in human skeletal muscle prevents tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance*. J Biol Chem, 2007. **282**(11): p. 7783-9.
32. de Alvaro, C., et al., *Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17070-8.
33. Rotter, V., I. Nagaev, and U. Smith, *Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects*. J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 45777-84.
34. Wei, Y., et al., *Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. **294**(3): p. R673-80.
35. Weigert, C., et al., *Direct cross-talk of interleukin-6 and insulin signal transduction via insulin receptor substrate-1 in skeletal muscle cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(11): p. 7060-7.
36. Franssen, F.M., E.F. Wouters, and A.M. Schols, *The contribution of starvation, deconditioning and ageing to the observed alterations in peripheral skeletal muscle in chronic organ diseases*. Clin Nutr, 2002. **21**(1): p. 1-14.
37. Dimopoulos, S., et al., *Peripheral muscle microcirculatory alterations in patients with pulmonary arterial hypertension: a pilot study*. Respir Care, 2013. **58**(12): p. 2134-41.
38. Barbosa, P.B., et al., *Kinetics of skeletal muscle O2 delivery and utilization at the onset of heavy-intensity exercise in pulmonary arterial hypertension*. Eur J Appl Physiol, 2011. **111**(8): p. 1851-61.

39. Xu, W., et al., *Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(4): p. 1342-7.
40. Romanello, V. and M. Sandri, *Mitochondrial biogenesis and fragmentation as regulators of muscle protein degradation*. Curr Hypertens Rep, 2010. **12**(6): p. 433-9.
41. Enache, I., et al., *Skeletal muscle mitochondrial dysfunction precedes right ventricular impairment in experimental pulmonary hypertension*. Mol Cell Biochem, 2013. **373**(1-2): p. 161-70.
42. Wust, R.C., et al., *Regional skeletal muscle remodeling and mitochondrial dysfunction in right ventricular heart failure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(2): p. H402-11.
43. Humbert, M., et al., *Advances in therapeutic interventions for patients with pulmonary arterial hypertension*. Circulation, 2014. **130**(24): p. 2189-208.
44. Pedersen, B.K. and B. Saltin, *Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases*. Scand J Med Sci Sports, 2015. **25 Suppl 3**: p. 1-72.
45. Tabet, J.Y., et al., *Benefits of exercise training in chronic heart failure*. Arch Cardiovasc Dis, 2009. **102**(10): p. 721-30.
46. Arena, R., et al., *The effect of exercise training on the pulmonary arterial system in patients with pulmonary hypertension*. Prog Cardiovasc Dis, 2015. **57**(5): p. 480-8.
47. 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.
48. Piepoli, M.F., et al., *Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH)*. BMJ, 2004. **328**(7433): p. 189.
49. Troosters, T., et al., *Pulmonary rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(1): p. 19-38.
50. Weinstein, A.A., et al., *Effect of aerobic exercise training on fatigue and physical activity in patients with pulmonary arterial hypertension*. Respir Med, 2013. **107**(5): p. 778-84.
51. Yuan, P., et al., *Exercise training for pulmonary hypertension: a systematic review and meta-analysis*. Int J Cardiol, 2015. **178**: p. 142-6.
52. Brown, M.B., et al., *High-intensity interval training, but not continuous training, reverses right ventricular hypertrophy and dysfunction in a rat model of pulmonary hypertension*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2017. **312**(2): p. R197-R210.
53. Handoko, M.L., et al., *Opposite effects of training in rats with stable and progressive pulmonary hypertension*. Circulation, 2009. **120**(1): p. 42-9.
54. Moreira-Goncalves, 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.
55. 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.
56. Souza-Rabbo, M.P., et al., *Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2008. **35**(8): p. 944-8.
57. Buys, R., A. Avila, and V.A. Cornelissen, *Exercise training improves physical fitness in patients with pulmonary arterial hypertension: a systematic review and meta-analysis of controlled trials*. BMC Pulm Med, 2015. **15**: p. 40.
58. Shoemaker, M.J., et al., *Exercise training in patients with pulmonary arterial hypertension: a case report*. Cardiopulm Phys Ther J, 2009. **20**(4): p. 12-8.

59. Soares, L., et al., *Exercise training and pulmonary arterial hypertension: A review of the cardiac benefits*. Science & Sports, 2018. **33**(4): p. 197-206.
60. Gonçalves, D., et al., *Exercise preconditioning prevents skeletal muscle wasting in monocrotaline-induced cardiac cachexia*, 2012, Federation of American Societies for Experimental Biology.
61. Nogueira-Ferreira, R., et al., *Mechanisms underlying the impact of exercise training in pulmonary arterial hypertension*. Respir Med, 2018. **134**: p. 70-78.
62. Hargett, L.A., et al., *Severe pulmonary arterial hypertensive rats are tolerant to mild exercise*. Pulm Circ, 2015. **5**(2): p. 349-55.
63. Weissmann, N., et al., *Structural and functional prevention of hypoxia-induced pulmonary hypertension by individualized exercise training in mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014. **306**(11): p. L986-95.
64. Zimmer, A., et al., *Effects of aerobic exercise training on metabolism of nitric oxide and endothelin-1 in lung parenchyma of rats with pulmonary arterial hypertension*. Mol Cell Biochem, 2017. **429**(1-2): p. 73-89.
65. Benoist, D., et al., *Systems approach to the study of stretch and arrhythmias in right ventricular failure induced in rats by monocrotaline*. Prog Biophys Mol Biol, 2014. **115**(2-3): p. 162-72.
66. Carneiro-Junior, 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.
67. Sahn, D.J., et al., *Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements*. Circulation, 1978. **58**(6): p. 1072-83.
68. Yeginsu, A. and M. Ergin, *Determination of optimal drying period in wet to dry weight ratio measurement*. Tuberk Toraks, 2010. **58**(1): p. 115-6.
69. Portes, L.A. and P.J. Tucci, *[Swim training attenuates myocardial remodeling and the pulmonary congestion in wistar rats with secondary heart failure to myocardial infarction]*. Arq Bras Cardiol, 2006. **87**(1): p. 54-9.
70. Wang, Z., et al., *Organ-level right ventricular dysfunction with preserved Frank-Starling mechanism in a mouse model of pulmonary arterial hypertension*. J Appl Physiol (1985), 2018. **124**(5): p. 1244-1253.
71. Alp, P.R., E.A. Newsholme, and V.A. Zammit, *Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates*. Biochem J, 1976. **154**(3): p. 689-700.
72. Reznick, A.Z. and L. Packer, *Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay*. Methods Enzymol, 1994. **233**: p. 357-63.
73. Schild, L., et al., *Short-term impairment of energy production in isolated rat liver mitochondria by hypoxia/reoxygenation: involvement of oxidative protein modification*. Biochem J, 1997. **328** (Pt 1): p. 205-10.
74. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
75. *Human energy requirements: report of a joint FAO/ WHO/UNU Expert Consultation*. Food Nutr Bull, 2005. **26**(1): p. 166.
76. Jonas, I., et al., *Behavioral traits are affected by selective breeding for increased wheel-running behavior in mice*. Behav Genet, 2010. **40**(4): p. 542-50.
77. Sherwin, C.M., *Voluntary wheel running: a review and novel interpretation*. Anim Behav, 1998. **56**(1): p. 11-27.
78. Festing, M.F., *Wheel activity in 26 strains of mouse*. Lab Anim, 1977. **11**(4): p. 257-8.

79. Agarwal, D., et al., *Role of proinflammatory cytokines and redox homeostasis in exercise-induced delayed progression of hypertension in spontaneously hypertensive rats*. *Hypertension*, 2009. **54**(6): p. 1393-400.
80. Kashimura, O., A. Sakai, and Y. Yanagidaira, *Effects of exercise-training on hypoxia and angiotensin II-induced pulmonary vasoconstrictions*. *Acta Physiol Scand*, 1995. **155**(3): p. 291-5.
81. Favret, F., et al., *Exercise training improves lung gas exchange and attenuates acute hypoxic pulmonary hypertension but does not prevent pulmonary hypertension of prolonged hypoxia*. *J Appl Physiol (1985)*, 2006. **100**(1): p. 20-5.
82. Crosswhite, P. and Z. Sun, *Molecular mechanisms of pulmonary arterial remodeling*. *Mol Med*, 2014. **20**: p. 191-201.
83. 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.
84. Ashor, A.W., et al., *Exercise modalities and endothelial function: a systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials*. *Sports Med*, 2015. **45**(2): p. 279-96.
85. Bechara, L.R., et al., *NADPH oxidase hyperactivity induces plantaris atrophy in heart failure rats*. *Int J Cardiol*, 2014. **175**(3): p. 499-507.
86. Soares, L.L., et al., *Exercise training and pulmonary arterial hypertension: A review of the cardiac benefits*. *Science & Sports*, 2018.
87. del Aguila, L.F., K.P. Claffey, and J.P. Kirwan, *TNF-alpha impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C2C12 muscle cells*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(5): p. E849-55.
88. Hotamisligil, G.S., et al., *Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha*. *J Clin Invest*, 1994. **94**(4): p. 1543-9.
89. Llimona, F., *Co-ativador de transcrição gênica PGC-1 na pancreatite aguda*, 2011, Universidade de São Paulo.
90. Medeiros, A., et al., *Efeito do treinamento físico com natação sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos*. *Revista Paulista de Educação Física*, 2000. **14**(1): p. 7-15.
91. Holmes, K., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition*. *Cell Signal*, 2007. **19**(10): p. 2003-12.
92. Colombo, R., et al., *Exercise training contributes to H2O2/VEGF signaling in the lung of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension*. *Vascul Pharmacol*, 2016. **87**: p. 49-59.

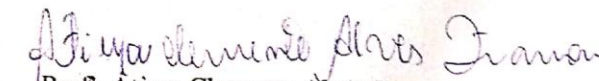
7. Anexo 1- Parecer de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais UFV

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 14/2017, intitulado "Influências do exercício físico no músculo esquelético de ratos com falha cardíaca", coordenado pelo professor Clóvis Andrade Neves do Departamento de Biologia Geral, 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 08/12/2017, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 14/2017, named "Influences of physical exercise on the skeletal muscle of rats with heart failure", 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 December 08, 2017 valid for 12 months.


Prof. Atima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV