

FRANCIANY DE JESUS SILVA

**EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBICO CONTÍNUO DE INTENSIDADE
MODERADA NOS VENTRÍCULO E PULMÃO DIREITOS DE RATOS
DURANTE A PROGRESSÃO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR**

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

Orientador: Antônio José Natali

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2019

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

T

S586e
2019
Silva, Franciany de Jesus, 1993-
Efeitos do treinamento aeróbico contínuo de intensidade moderada nos ventrículo e pulmão direitos de ratos durante a progressão da hipertensão arterial pulmonar / Franciany de Jesus Silva. – Viçosa, MG, 2019.
67 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Antônio José Natali.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 60-67.

1. Exercícios aeróbicos. 2. Artéria pulmonar.
3. Monocrotalina. 4. Miócitos cardíacos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Educação Física. Programa de Pós-Graduação Educação Física. II. Título.

CDD 22. ed. 613.7

FRANCIANY DE JESUS SILVA

**EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBICO CONTÍNUO DE INTENSIDADE
MODERADA NOS VENTRÍCULO E PULMÃO DIREITOS DE RATOS
DURANTE A PROGRESSÃO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR**

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

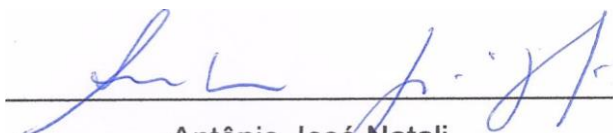
APROVADA: 27 de setembro de 2019.

Assentimento:



Franciany de Jesus Silva

Autora



Antônio José Natali

Orientador

A Deus.
À minha família.
Aos animais experimentais.

AGRADECIMENTOS

Ao concluir esta dissertação de mestrado, agradeço:

A Deus, por ter conduzido o meu caminho e tornado possível essa conquista;

Aos meus pais Neuza e Francisco e aos irmãos Flávia, Fábio, Fabiano, Fernando e Fabrícia, pelo exemplo de vida, apoio e amor incondicional;

Aos meus sobrinhos Pedro Arthur, Júlia, Maria Fernanda, Lara e Isabelly, por me fazerem sentir tão especial e amada;

Aos meus cunhados Rondinele, Gabriela, Fernanda e Gleison, pelo apoio e carinho;

Ao meu orientador, professor, Antônio José Natali, pelo exemplo de profissional, pela orientação, apoio, ensinamentos e por contribuir com a minha formação profissional.

Ao senhor Adão e ao Juliano, pela paciência e disponibilidade para preparar os animais utilizados neste trabalho.

À professora Emily Correna Carlo Reis, pela realização da ecocardiografia nos animais;

Ao Laboratório de Biologia Estrutural e ao Laboratório de Sistemática Molecular.

Aos professores Mariana Machado Neves e Jorge Adbala Dergam dos Santos, pela disponibilização de equipamentos e materiais para execução das análises histomorfométricas.

Ao Matheus Rangel Jotta da Silva e ao Luiz Carlos Maia Ladeira, pelo auxílio nas técnicas histomorfométricas;

À Maíra Oliveira Freitas bolsista de iniciação científica, pelo auxílio no cuidado e atenção para com os animais;

Aos colegas de pós-graduação e do laboratório Filipe Rios Drummond, Meilene Ribeiro Fidélis, Tiago Ferreira Leal, Leonardo Mateus Teixeira de Rezende e Anselmo Gomes de Moura, pelo auxílio nos experimentos e pelos momentos de convivência e amizade;

Aos colegas de laboratório e da pós-graduação Alexandre Jayme Lopes Dantas, Leôncio Lopes Soares, Juliano Magalhaes Guedes, Rafael Marins Rezende, Pedro Zavagli Suarez, Alexandre Martins Oliveira Portes, Sabrina Fontes Domingues, Aline Carare Candido, Francilene Maria Azevedo pelos momentos de estudo e de descontração;

Aos Professores Miguel Araújo Carneiro Júnior e Thales Nicolau Primola Gomes, pelos ensinamentos;

Às amigas Aurora Corrêa Rodrigues, Bheatriz Aparecida Assis, Cleds Bussinger Lenz César, Deyliane Aparecida de Almeida Pereira, Sabrina dos Santos Silva pelo apoio e amizade.

Às colegas de república: Débora Furtado de Mendonça, Ana Luiza Pereira Martins e Tamires de Oliveira Silva, pela boa convivência e por todas felicidades compartilhadas.

Aos amigos da Igreja Presbiteriana de Viçosa, especialmente aos amigos do Grupo de Convivência: Adassa Gama Tavares, Caito André Kunrath, Jaqueline da Silva Kunrath, Juan Esteban Nino, Lorena Lisbetd Botina Jojoa, Marcelo Abreu de Oliveira e Priscila Faiz de Paula e do Grupo de oração;

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

Aos professores Emily Correna Carlo Reis e Mauro César Isoldi, por aceitarem o convite para participar da minha banca.

Enfim, a todos que de alguma forma participaram direta ou indiretamente da realização desse trabalho.

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

RESUMO

SILVA, Franciany de Jesus, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2019. **Efeitos do treinamento aeróbico contínuo de intensidade moderada nos ventrículo e pulmão direitos de ratos durante a progressão da hipertensão arterial pulmonar.** Orientador: Antônio José Natali.

Objetivo: Verificar os efeitos do treinamento aeróbico contínuo de intensidade moderada sobre a hemodinâmica e a resistência da artéria pulmonar, a estrutura dos ventrículo e pulmão direitos e sobre a função contrátil e o cálcio (Ca^{2+}) intracelular transiente em miócitos isolados do ventrículo direito (VD) de ratos durante o desenvolvimento da hipertensão arterial pulmonar (HAP) induzida por monocrotalina (MCT). **Material e Métodos:** Ratos Wistar (idade: ~ 2 meses; massa corporal: ~230g) foram divididos em quatro grupos de 12 animais cada, a saber: controle sedentário (CS); controle treinado (CT); MCT sedentário (MS); MCT treinado (MT). Animais dos grupos MS e MT receberam uma injeção intraperitoneal (60 mg/kg) de MCT, enquanto os dos grupos CS e CT receberam o mesmo volume de solução salina. Os grupos treinados foram submetidos a um programa de corrida em esteira rolante com intensidade moderada (60 min/dia; 60% da velocidade máxima de corrida; 5 dias/semana) durante 4 semanas, iniciado após a injeção de MCT. A avaliação ecocardiográfica foi realizada no 24º dia após a aplicação de MCT. A tolerância ao esforço físico foi avaliada no 25º dia após a aplicação de MCT. Após a eutanásia, o coração e os pulmões foram removidos, pesados e processados para as análises. Nos tecidos do VD e pulmão direito foram realizadas análises histomorfométricas. Em miócitos isolados do VD foram analisadas contração e Ca^{2+} intracelular transiente. **Resultados:** O programa de treinamento aeróbico aumentou a tolerância ao exercício e reduziu a resistência da artéria pulmonar (TA/TE). Em nível tecidual, o treinamento aeróbico reduziu ($p < 0.05$) a massa do VD, a área de secção transversa dos miócitos e o percentual de colágeno. No pulmão direito, o treinamento aeróbico reduziu ($p < 0.05$) o espaçamento entre os alvéolos e o percentual de colágeno. Em miócitos isolados do VD, o treinamento aeróbico reduziu ($p < 0.05$) o volume celular, os tempos para o pico e para 50% de relaxamento, assim como a amplitude e os tempos para o pico e para 50% de decaimento do Ca^{2+} intracelular transiente. **Conclusões:** O treinamento aeróbico contínuo de intensidade moderada atenua a resistência da artéria

pulmonar, previne o remodelamento adverso dos ventrículo e 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. Juntos, estes efeitos resultam em maior tolerância ao esforço físico.

Palavras-chave: Exercício aeróbico. Artéria pulmonar. Monocrotalina. Miócito cardíaco.

ABSTRACT

SILVA, Franciany de Jesus, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2019. **Effects of continuous aerobic training of moderate intensity on the right ventricle and lung of rats during the progression of pulmonary arterial hypertesion.** Adviser: Antônio José Natali.

Objective: To verify the effects of continuous aerobic training of moderate-intensity on the hemodynamic and resistance of the pulmonary artery, on the right ventricle (RV) and lung structure, and on contraction and intracellular calcium (Ca^{2+}) transient in isolated RV myocytes of rats during the development of pulmonary arterial hypertension (PAH) induced by monocrotaline (MCT).

Material and Methods: Wistar rats (age: ~ 2 months; body mass: ~ 230g) were divided into four groups of 12 animals each: sedentary control (SC); trained control (TC); sedentary MCT (SM); trained MCT (TM). Animals from SM and TM groups received an intraperitoneal injection (60 mg / kg) of MCT, while animals from SC and TC groups received the same volume of saline solution. Animals from trained groups were submitted to a treadmill running program of moderate intensity (60 min / day; 60% of the maximum running speed; 5 days / week) for 4 weeks, starting after the MCT injection. The echocardiographic evaluation was performed on the 24th day after MCT injection. The physical effort tolerance was assessed on the 25th day after MCT injection. After euthanasia, the heart and lungs were removed, weighed and processed for analysis. Histomorphometric analysis were performed in the RV and right lung tissues. Contraction and intracellular Ca^{2+} transient were analyzed in isolated RV myocytes. **Results:** The continuous aerobic training of moderate intensity increased the tolerance o physical effort and reduced the pulmonary artery resistance (TA/TE). At the tissue level, the aerobic training reduced ($p < 0.05$) the RV mass, the myocyte cross-sectional area and the percentage of collagen. In the right lung, the aerobic training reduced ($p < 0.05$) the space between alveoli and the percentage of collagen. In RV isolated myocytes, the aerobic training reduced ($p < 0.05$) cell volume, the times to peak and to 50% relaxation of contraction as well as the amplitude and the times to peak and to 50% decay of the intracellular Ca^{2+} transient. **Conclusions:** Continuous aerobic training of moderate intensity attenuates pulmonary artery resistance, prevents adverse remodeling of the right ventricle and lung, and promotes benefits to contraction and the intracellular Ca^{2+}

transient in RV isolated myocytes during MCT-induced PAH progression in rats. Together, these effects result in greater tolerance to physical effort.

Keywords: Aerobic exercise. Pulmonary artery. Monocrotaline. Cardiac myocyte.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental	26
Figura 2. Dados do teste de tolerância ao esforço físico.....	38
Figura 3. Resistência da artéria pulmonar.....	40
Figura 4. Contração em miócitos isolados do ventrículo direito	41
Figura 5. Cálcio intracelular transiente em miócitos isolados do ventrículo direito	43
Figura 6. Área de secção transversa de miócitos do ventrículo direito	44
Figura 7. Largura, comprimento e volume celular de miócitos isolados do ventrículo direito.....	45
Figura 8. Fotomicrografias representativas do ventrículo direito	47
Figura 9. Fotomicrografias representativas do pulmão direito.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Massa corporal e dos órgãos.....	37
Tabela 2. Proporção histomorfométrica entre os elementos teciduais do ventrículo direito.....	48
Tabela 3. Proporção histomorfométrica entre os elementos teciduais do pulmão direito.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância

AST: área de secção transversa

ATPase: enzima que catalisa a hidrólise do ATP para produção de energia

β -MHC: miosina de cadeia pesada beta

Ca²⁺: íon cálcio

CaCl₂: cloreto de cálcio

CEUA-UFV: Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CS: controle sedentário

CT: controle treinado

EFG: fator de crescimento epidérmico

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

ET-1: endotelina 1

FGF: fator de crescimento de fibroblastos

FURA-2AM: Éster Fura-2-acetoximetílico

H & E: hematoxilina e eosina

HAP: hipertensão arterial pulmonar

HIV: vírus da Imunodeficiência Humana

IGF: fator de crescimento semelhante a insulina

MCT: monocrotalina

mmHg: milímetros de mercúrio

MS: monocrotalina sedentário

MT: monocrotalina treinado

Na⁺: íon sódio

NaCl: cloreto de sódio

NCX: trocador de Na⁺/ Ca²⁺

p-Akt: proteína quinase B fosforilada

PASMC: proliferação de células do músculo liso da artéria pulmonar

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

PLB: fosfolamban

RANTES: *regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*

RVP: resistência vascular pulmonar

RyR2: canais receptores de rianodina do tipo 2

SERCA2a: isoforma cardíaca da Ca²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático

TA/TE: razão tempo de aceleração pelo tempo de ejeção

TA: tempo de aceleração do fluxo na artéria pulmonar

TAPSE: excursão sistólica do plano anular tricúspide

TE: tempo de ejeção

TGF-beta: fator de crescimento transformador beta

TNF α : fatores de Necrose Tumoral

VD: ventrículo direito

VE: ventrículo esquerdo

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

WU: unidades Wood

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Fisiopatologia da hipertensão arterial pulmonar	17
1.2. Terapias para hipertensão arterial pulmonar	20
2. OBJETIVOS	24
2.1. Geral	24
2.2. Específicos	24
3. HIPÓTESES	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Aspectos éticos.....	25
4.2. Animais e desenho experimental	25
4.3. Teste de tolerância ao esforço físico	26
4.4. Indução da hipertensão arterial pulmonar.....	27
4.5. Protocolo de treinamento físico.....	27
4.6. Ecocardiografia	27
4.7. Coleta de amostras de tecidos	28
4.8. Isolamento de miócitos do ventrículo direito	29
4.8.1. Composição das soluções	30
4.8.2. Solução de perfusão-tampão HEPES.....	30
4.9. Mensuração do comprimento, largura e volume celular	31
4.10. Mensuração da contração celular	31
4.11. Mensuração do cálcio intracelular transiente	32
4.12. Análises histomorfométricas	33
4.13. Análises estatísticas	35
5. RESULTADOS	36
5.1. Massa corporal e dos órgãos.....	36
5.2. Tolerância ao esforço físico	38

5.3. Hemodinâmica e resistência da artéria pulmonar.....	39
5.4. Contração celular.....	40
5.5. Cálcio intracelular transiente.....	42
5.6. Dimensões dos miócitos do ventrículo direito.....	43
5.7. Proporções histomorfométricas entre os elementos teciduais dos ventrículo e pulmão direitos.....	46
6. DISCUSSÃO.....	52
6.1. Massa corporal e dos órgãos.....	52
6.2. Tolerância ao esforço físico.....	53
6.3. Hemodinâmica e resistência da artéria pulmonar.....	54
6.4. Contração celular e cálcio intracelular transiente.....	55
6.5. Histomorfometria do ventrículo direito.....	56
6.6. Histomorfometria do pulmão direito.....	58
7. CONCLUSÕES.....	59
8. REFERÊNCIAS.....	60

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão pulmonar é uma doença caracterizada por elevação persistente da resistência vascular pulmonar decorrente de remodelamento vascular, vasoconstrição e fenômenos trombóticos. A hipertensão pulmonar gera um aumento na pressão arterial pulmonar média a 25 mmHg ou mais, em repouso, ocasionando múltiplas condições clínicas que podem complicar doenças cardiovasculares e respiratórias (1-3).

Clinicamente (4), a hipertensão pulmonar é classificada em 5 categorias, sendo elas: 1) hipertensão arterial pulmonar; 2) hipertensão venosa pulmonar; 3) hipertensão pulmonar associada a distúrbios do sistema respiratório ou hipóxia; 4) hipertensão pulmonar causada por doenças trombóticas ou embólicas; 5) hipertensão pulmonar causada por doenças que afetam a vasculatura pulmonar (5). A prevalência da hipertensão pulmonar é de 1% da população mundial, com incidência de até 10% em indivíduos com mais de 65 anos (5).

A hipertensão arterial pulmonar é caracterizada pela presença de hipertensão pulmonar pré-capilar, definida por uma pressão arterial de artéria pulmonar média, em repouso, ≥ 20 mmHg, pressão capilar pulmonar ≤ 15 mmHg e resistência vascular pulmonar ≥ 3 unidades Wood (3).

Clinicamente (3), a hipertensão arterial pulmonar é classificada em grupos, sendo eles: 1) hipertensão arterial pulmonar idiopática; 2) hipertensão arterial pulmonar hereditária; 3) hipertensão arterial pulmonar induzida por drogas e toxinas; 4) hipertensão arterial pulmonar associada a doença do tecido conjuntivo, infecção por HIV (vírus da imunodeficiência humana), hipertensão portal, doenças cardíacas congênitas e esquistossomose; 5) hipertensão arterial pulmonar devido a doença cardíaca esquerda; 6) hipertensão arterial pulmonar por resposta a longo prazo aos bloqueadores dos canais de cálcio; 7) hipertensão arterial pulmonar com características evidentes do envolvimento de vasos venoso/capilar; e 8) mecanismos pouco claros e multifatoriais (6).

A incidência de hipertensão arterial pulmonar varia de 11 a 26 pacientes por milhão de adultos, tendo maior prevalência na faixa etária dos 36 e 52 anos (7). Na infância, a HAP afeta igualmente ambos os sexos; após a puberdade é mais frequente no sexo feminino (8, 9).

1.1. Fisiopatologia da hipertensão arterial pulmonar

Embora a patogênese da hipertensão arterial pulmonar seja pouco conhecida, sabe-se que a elevação da resistência arterial pulmonar é resultante de alterações vasoconstritivas e vasoclusivas decorrentes de lesão vascular e que estes parecem ser mecanismos patogénéticos comuns compartilhados. A hipertensão arterial pulmonar tem uma biopatologia que envolve várias vias bioquímicas e tipos celulares (1, 10). Fatores ambientais, suscetibilidade genética, cardiopatias congênitas, expressão alterada de substâncias efetoras vasculares, auto-imunidade, exposição a drogas, vírus e toxinas são algumas das condições implicadas na etiopatogenia da doença (2).

Na circulação pulmonar normal, o tônus vascular tende a ser reduzido em decorrência de um equilíbrio entre mecanismos vasodilatadores e vasoconstritores. A perda desse equilíbrio pode favorecer a vasoconstrição, remodelamento vascular e trombose que obliteram o lúmen vascular levando a um aumento da resistência ao fluxo. Essa perda de equilíbrio da homeostase é, provavelmente, consequente à lesão ou disfunção da célula endotelial e do musculo liso vascular pulmonar (11).

A vasoconstrição vascular pulmonar está associada ao influxo aumentado de cálcio através da membrana celular, via canais de cálcio tipo L dependente de voltagem. A proliferação celular em vasos pulmonares e o remodelamento da matriz extracelular, junto com a vasoconstrição, constituem o marco fisiopatológico da hipertensão arterial pulmonar (11).

Mecanismos pró-inflamatórios também estão envolvidos na gênese da hipertensão arterial pulmonar. Infiltrados perivasculares compostos de macrófagos e linfócitos, níveis plasmáticos elevados de citocinas, tais como a interleucina-1 e interleucina-6, a expressão elevada de quimiocinas, como *regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted* (RANTES) e fractalcinas sinalizam a participação dos componentes inflamatórios como um dos mecanismos da doença (10).

A hipertensão pulmonar cursa com o desequilíbrio entre proliferação celular e apoptose, em favor dos mecanismos proliferativos, levando a um espessamento da parede e obliteração do lúmen vascular, com consequente aumento da resistência vascular pulmonar (10, 11) .

Vários fatores estão envolvidos no remodelamento vascular. Dentre eles, o fator de crescimento transformador beta (TGF-beta) (12), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (13), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (14), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (15) e o fator de crescimento epidérmico (EGF), além de endotelina 1 (ET-1) e serotonina (5-hidroxitriptamina - 5HT) (16).

Os fatores de crescimento mediam mecanismos relacionados à inflamação, imunidade, diferenciação celular e formação de lesões vasculares. Em condições normais, os pulmões retiram a ET-1 da circulação pulmonar, entretanto, na hipertensão arterial pulmonar, os níveis de ET-1 ficam muito elevados. A 5 HT está relacionada à hiperplasia e hipertrofia de células inflamatórias (17), todavia, o óxido nítrico e as prostaciclina atuam inibindo o remodelamento vascular adverso (18).

Segundo Vonk et al.(19), o aumento da resistência vascular pulmonar leva ao aumento da pós-carga no ventrículo direito e, para compensar esse aumento, ocorre hipertrofia concêntrica do ventrículo direito. A função do ventrículo direito, é mantida pelo aumento da força de contração ventricular. Para preservar o volume sistólico e manter o débito cardíaco, o ventrículo direito se dilata, resultando em aumento da frequência cardíaca (19). Com a progressão da doença, o processo hipertrófico é interrompido e o volume sistólico diminui.

Nestas condições, o ventrículo direito é ainda mais sobrecarregado e perde progressivamente sua função até atingir a falha ventricular (20-23). Esta é a principal causa de morte entre pacientes com hipertensão arterial pulmonar (24-26). De acordo com os mesmos autores, essa insuficiência cardíaca direita é marcada por uma redução na perfusão do miocárdio e isquemia, aumento do volume diastólico final, dilatação do ventrículo, redução do volume sistólico e redução do débito cardíaco.

Em nível tecidual, os aumentos da pressão diastólica final e do tempo de decaimento da pressão ventricular e, especialmente, a redução da TAPSE (Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion), em modelo animal de hipertensão arterial pulmonar, são justificados pelas alterações neuro-humorais (ex. BNP, VEGF e ET-1 aumentadas) e na matriz extracelular (ex. TNF α e colágeno aumentados) do ventrículo direito, além do aumento da deposição de inflamação e fibrose (27-29). Tais alterações reduzem a elasticidade ventricular e, conseqüentemente, a eficiência mecânica.

Em nível celular, a hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina promove anormalidades no processo de acoplamento-excitação-contração em cardiomiócitos isolados do ventrículo direito de ratos (30, 31). Por exemplo, a contração celular apresenta menor amplitude e velocidades de contração e relaxamento mais lentas. Da mesma forma, o cálcio intracelular transiente possui menor amplitude e maiores tempos para o pico e para o decaimento (32).

Em nível molecular, a hipertensão arterial pulmonar afeta negativamente as proteínas contráteis e as reguladoras do cálcio intracelular. Por exemplo, o ventrículo direito de ratos com HAP apresentam aumento da miosina de cadeia pesada beta (β -MHC) (27) e redução da expressão gênica dos receptores de rianodina (RyR), da cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático-2a (SERCA2a) e da fosfolambam (PLB) (33, 34), o que resulta em capacidade contrátil celular reduzida.

No tecido pulmonar, a hipertensão arterial pulmonar desenvolve hipertrofia da camada média das artérias, com acúmulo de fibrose na camada íntima. Isto resulta em vasoconstrição e obstrução luminal grave, levando a um remodelamento vascular pulmonar irreversível, que está associado a um mau prognóstico (35). Além disso, foi demonstrado (36, 37) na histologia pulmonar de ratos com hipertensão pulmonar, um aumento do espaço alveolar e da espessura da parede alveolar. Além disso, observou-se diminuição dos septos secundários, proliferação de células do músculo liso da artéria pulmonar, maior deposição de colágeno, aumento da espessura da parede arterial pulmonar, aumento da estenose luminal e excesso de células inflamatórias.

Em relação ao quadro clínico da hipertensão arterial pulmonar, de acordo com Lopes et al. (8), os sintomas habitualmente surgem numa fase tardia da doença, onde importantes alterações na hemodinâmica cardiopulmonar já se estabeleceram. Nos estágios iniciais, o paciente geralmente é assintomático ou tem queixas vagas e inespecíficas aos esforços físicos maiores. Com o passar do tempo, surgem os sintomas de ineficiência ventilatória, dor torácica, tosse, tonturas e a fadiga progressiva a esforços físicos, isso decorre devido ao remodelamento adverso do ventrículo direito e à hipoxemia (8).

De acordo com Babu et al. (38), a intolerância ao exercício físico abrange uma interação complexa entre os sistemas cardiovascular, pulmonar e musculoesquelético. Estudos (20, 39-41) relatam que a capacidade limitada de

exercício físico nesta doença é causada por vários fatores, tais como insuficiência cardíaca direita, troca gasosa pulmonar alterada e músculos esqueléticos enfraquecidos. O exercício físico induz um aumento temporário na pressão da artéria pulmonar e na pós-carga do ventrículo direito, resultando em aumento temporário do estresse na parede do ventrículo. Como a hipertensão arterial pulmonar leva à falha do ventrículo direito, conseqüentemente, esse apresentará uma capacidade reduzida em aumentar o volume sistólico durante o exercício físico, isso é o que limita a prática de exercícios físicos pelos portadores desta doença.

Para compreender os mecanismos fisiopatológicos da hipertensão arterial pulmonar em humanos, o modelo animal tem sido amplamente utilizado. O uso de ratos como modelo animal experimental é racional do ponto de vista econômico, disponibilidade, além de que os ratos apresentam quase 99% dos genes e são fisiologicamente semelhante aos humanos, tornando-o um candidato ideal para estudar as funções dos genes humanos na saúde, bem como na regulação de doenças multifatoriais (42).

A monocrotalina (MCT) é comumente usada para a indução da hipertensão pulmonar. A monocrotalina é um alcaloide derivado de sementes da planta *Crotalaria spectabilis*, que produz *desidromonocrotal* quando metabolizado pelo fígado. Esse produto metabólico causa uma toxicidade, resultando em hipertensão pulmonar progressiva (43, 44). A administração subcutânea de uma dose (60 mg/kg) de monocrotalina em ratos tem sido usada como um modelo de desenvolvimento lento da hipertensão arterial pulmonar, com presença de hipertrofia do ventrículo direito, alteração semelhante à ocorrida em pacientes com esta doença (45, 46).

1.2. Terapias para hipertensão arterial pulmonar

Tradicionalmente, a hipertensão arterial pulmonar é considerada uma doença de poucas opções terapêuticas, com dificuldade no manuseio e mal prognóstico (8). A causa mais comum de morte entre os pacientes com hipertensão arterial pulmonar é a insuficiência cardíaca direita. Nesse sentido, medidas que refletem o desempenho do ventrículo direito predizem o desfecho no início e durante o acompanhamento (26).

Terapias como a oxigenioterapia, o uso de anticoagulantes, diuréticos, agentes inotrópicos, bloqueadores de canais de cálcio, vasodilatadores e inibidores de

agregação plaquetária, antagonistas dos receptores de endotelina e inibidores de fosfodiesterase, assim como procedimentos intervencionistas (ex.: septostomia atrial, tromboendarterectomia pulmonar) são empregados.

Dadas as profundas consequências clínicas de pressões pulmonares elevadas, na função do ventrículo direito, diversas terapias têm sido propostas a fim de restaurar a capacidade vasodilatadora, reduzir a proliferação celular, melhorar a hemodinâmica para reduzir as pressões pulmonares, aumentar a classe funcional, e por consequência, melhorar a qualidade de vida, a capacidade de exercício e a sobrevivência (7, 47, 48).

Embora a terapia medicamentosa tenha apresentado melhoras dos sintomas e desaceleração da progressão da doença, Dalla Vecchia e Bussotti (25) relatam um outro problema que continua em evidência: os graves efeitos psicológicos em pacientes com hipertensão arterial pulmonar. Estudos anteriores (49, 50) diagnosticaram uma alta prevalência de ansiedade, depressão, desesperança e ataques de pânico em pacientes com hipertensão arterial pulmonar, sendo que essas variáveis foram correlacionados com uma redução da qualidade de vida.

Quanto às terapias adjuvantes, crescem as evidências em humanos (51-57) e em modelos animais (25, 34, 43, 58-60) de que o treinamento físico aeróbio pode promover efeitos benéficos a pacientes com hipertensão arterial pulmonar.

As respostas agudas ao exercício em indivíduos com hipertensão arterial pulmonar, baseiam-se em que a rigidez da artéria pulmonar e a disfunção vasodilatadora que aumentam significativamente a resistência vascular pulmonar, prejudicando o volume sistólico do ventrículo direito e o débito cardíaco. Além disso, em pacientes com a doença avançada, ocorre a incompatibilidade entre a ventilação e perfusão, podendo diminuir a saturação de oxigênio arterial, o que resulta em uma oferta inadequada para a periferia. Isso, coletivamente, contribui para a dispneia ao esforço físico, fadiga e redução da capacidade de exercício físico (7).

Outros estudos (47, 55, 61) mencionaram os efeitos favoráveis do treinamento físico em pacientes com hipertensão arterial pulmonar. Contudo, o exercício físico não era mencionado para o tratamento da hipertensão arterial pulmonar, pois acreditava-se ser este irrelevante, considerando a baixa taxa de sobrevida dos pacientes e o medo de piora mais rápida da função cardíaca direita (25).

No entanto, Mereles et al. (53) em um ensaio controlado randomizado avaliaram as respostas crônicas do treinamento aeróbico em mulheres com hipertensão arterial pulmonar. De fato, os resultados forneceram provas contundentes que apoiam a segurança e eficácia do treinamento físico para melhorar a capacidade de exercício, o pico de consumo de oxigênio e a qualidade de vida destas mulheres. Chan et al.(47) também demonstraram que o treinamento aeróbico em esteira, melhora a função cardiorrespiratória e a qualidade de vida, sendo que nenhum efeito adverso foi observado.

Em modelo animal, foi demonstrado (43) que o treinamento aeróbico reduziu a taxa de mortalidade, a hipertrofia patológica do ventrículo direito e os níveis de estresse oxidativo. Ainda, em nível tecidual, Handoko et al. (58) reportaram que o treinamento aeróbico reduziu a resistência vascular pulmonar, aumentou a capilarização do ventrículo direito e amenizou o remodelamento vascular pulmonar. Os resultados encontrados no estudo de Pacagnelli et al.(62) mostram que o treinamento aeróbico normalizou o fluxo da artéria pulmonar, diminuiu a hipertrofia do ventrículo direito com redução significativa da área de secção transversa dos cardiomiócitos, porém, sem alterar as proteínas envolvidas na regulação do cálcio em cardiomiócitos.

Em nível celular, Natali et al.(59), demonstraram que treinamento físico aeróbico intermitente (corrida voluntária) resultou em melhora na contratilidade e nas repostas ao aumento de demanda contrátil em cardiomiócitos isolados do ventrículo direito de ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina. Outro estudo (63) mostrou que a corrida voluntária realizada durante o desenvolvimento da hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina previne os prejuízos na função contrátil das células (maior amplitude e menores tempos para o pico e de relaxamento) e no transiente intracelular de cálcio (maior amplitude e menores tempos para o pico e de relaxamento) nos miócitos isolados do ventrículo direito.

Em nível molecular, foi demonstrado que a melhora da função ventricular em ratos com hipertensão arterial pulmonar ocorre em resposta ao treinamento físico aeróbico de intensidade moderada e está associada à redução de β -MHC (27) e à maior expressão de SERCA2a (34).

Em relação ao tecido pulmonar, Colombo et al.(13) identificou uma correlação positiva entre os níveis de peróxido de hidrogênio e a sinalização para angiogênese

dependente de VEGF no parênquima pulmonar de animais com HAP submetidos ao treinamento aeróbico. Este mesmo estudo, relatou que o lúmen dos novos vasos pode aumentar de 5 a 10 vezes, diminuindo a resistência colateral ao fluxo sanguíneo.

No entanto, os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pelos efeitos do treinamento físico nestes pacientes ainda não são bem compreendidos. A funcionalidade do ventrículo direito determina o prognóstico de sobrevivência dos pacientes com hipertensão arterial pulmonar (21, 22), ou seja, enquanto a funcionalidade do ventrículo direito é mantida, os pacientes apresentam poucos sintomas. Desta forma, estratégias terapêuticas que possam manter ou aumentar a funcionalidade cardíaca e pulmonar em portadores de hipertensão arterial pulmonar são de grande relevância para o tratamento desta doença.

Nesse sentido, o exercício físico aeróbio de intensidade moderada poderia ser uma estratégia terapêutica eficaz. Todavia, os efeitos do exercício aeróbico contínuo de intensidade moderada sobre a contratilidade, regulação do cálcio intracelular, morfologia e estrutura cardiopulmonar não são completamente conhecidos. Assim, é necessário investigar estes aspectos, pois a ampliação do conhecimento a respeito dessa temática possibilitará a adequação de estratégias de prescrição de treinamento aeróbico para indivíduos com hipertensão arterial pulmonar, de forma que se tornem mais seguras e eficazes.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

Avaliar os efeitos do treinamento aeróbico contínuo de intensidade moderada, realizado durante a progressão da hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina, sobre a estrutura e a função do coração e do pulmão de ratos.

2.2. Específicos:

Verificar se o treinamento aeróbico contínuo de intensidade moderada, executado durante a progressão da hipertensão induzida por monocrotalina, afeta em ratos:

- A função hemodinâmica e a resistência da artéria pulmonar;
- A tolerância ao esforço físico;
- As dimensões de miócitos do ventrículo direito;
- A organização tecidual dos ventrículo e pulmão direitos;
- A função contrátil em miócitos isolados do ventrículo direito;
- O Ca^{2+} intracelular transiente em miócitos isolados do ventrículo direito.

3. HIPÓTESES

H₀ - Esta hipótese se contrapõe à hipótese a seguir.

H₁ - O treinamento aeróbico contínuo de intensidade moderada, realizado durante a progressão da hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina, atenua os prejuízos impostos pela doença na resistência da artéria pulmonar, na estrutura dos ventrículo e pulmão direitos e na função contrátil e Ca^{2+} intracelular transiente em miócitos isolados do ventrículo direito de ratos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV) sob o protocolo nº 47/2018.

4.2. Animais e desenho experimental

Quarenta e oito ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), com 7 semanas idade e massa corporal de ~230 g foram utilizados. Os animais foram provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, MG e transportados até o Laboratório de Biologia do Exercício (BIOEX), situado no Departamento de Educação Física da UFV, onde aconteceram os procedimentos experimentais. Foram alojados em caixas de polietileno, com até 5 ratos por caixa, mantidos em ambiente com temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, regime de luminosidade de claro/escuro de 12 horas, umidade relativa de ~ 60% e receberam água filtrada e ração comercial *ad libitum*. Todos os animais foram pesados em balança digital (Rochelle, Brasil), em dias alternados, às 07h00min. A partir do 24º dia após a aplicação de monocrotalina ou salina, os animais foram pesados diariamente até o dia da eutanásia. O desenho experimental do estudo pode ser visualizado na figura 1. Foram formados, aleatoriamente, 4 grupos experimentais de 12 animais cada (6 para análises de contratilidade e transiente; e 6 para análises histomorfométricas), a saber:

- 1) Grupo Controle Sedentário (CS, n = 12): ratos que receberam solução de salina e não foram submetidos ao treinamento;
- 2) Grupo Controle Treinado (CT; n = 12): ratos que receberam solução de salina e foram submetidos ao treinamento;

3) Grupo Monocrotalina Sedentário (MS; n = 12): ratos que receberam solução de monocrotalina e não foram submetidos ao treinamento;

4) Grupo Monocrotalina Treinado (MT; n = 12): ratos que receberam solução monocrotalina e foram submetidos ao treinamento.

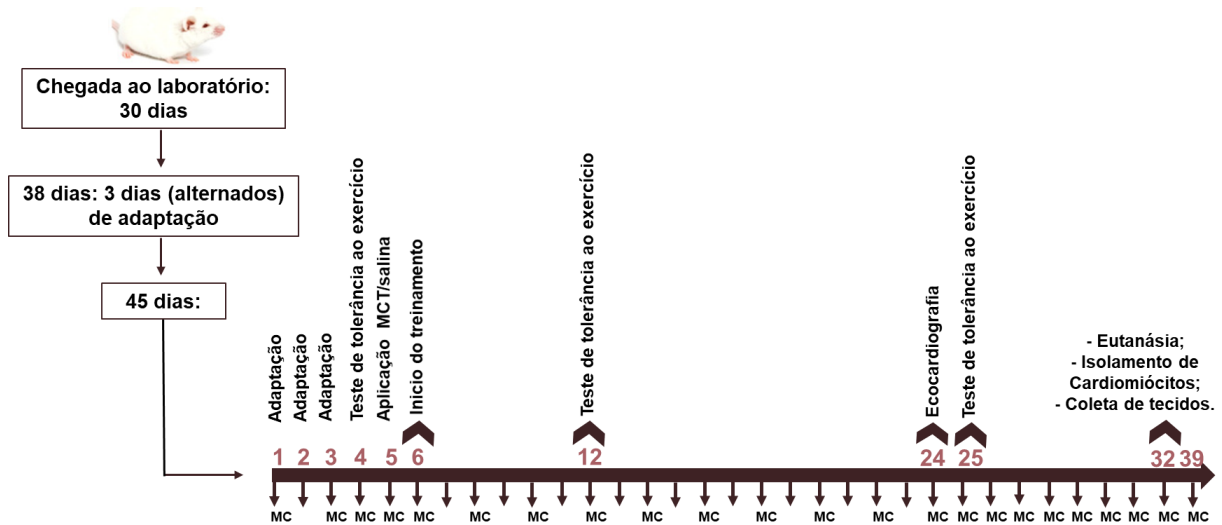


Figura 1. Desenho experimental. MC: mensuração da massa corporal. A linha na horizontal é a linha temporal dos procedimentos. As setas na vertical abaixo da linha indicam os dias.

4.3. Teste de tolerância ao esforço físico

A tolerância ao esforço físico foi medida pela distância total percorrida, avaliada por um protocolo de exercício progressivo em esteira, como previamente descrito (64). Resumidamente, os ratos foram familiarizados com a esteira rolante elétrica (AVS Projetos®, São Paulo, Brasil) por 2 semanas. Na semana 1 foram submetidos a um curto período de exercício leve (5 min, sem inclinação, 5 m/ min) por 3 dias (alternados). Na semana 2 (10 min/dia, sem inclinação, 5m/min) por 3 dias (consecutivos). Vinte e quatro horas após o período de adaptação foi realizado o teste.

A intensidade do exercício inicial foi 5m/min e incrementos de 3m/min a cada 3 minutos, sem inclinação, até a fadiga. O momento da fadiga foi definido e o teste

interrompido quando os animais não mantiveram a corrida de acordo com a velocidade da esteira (65). Ao término foram registrados o tempo, velocidade e intensidade de corrida de cada rato. O teste foi realizado em todos os grupos experimentais 1 dia antes e 25 dias após o período de tratamentos. No 12º dia de treinamento foi realizado o mesmo teste para ajustar a velocidade de treinamento. A velocidade de corrida usada no treinamento físico foi definida como 60% da velocidade máxima de corrida (VMC) obtida no teste de tolerância ao exercício.

4.4. Indução da hipertensão arterial pulmonar

Os animais dos grupos MS e MT receberam uma única injeção intraperitoneal (60 mg/kg de peso corporal) de monocrotalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) dissolvida em solução salina (NaCl 140 mM; pH 7.4) para o desenvolvimento da HAP (59). O mesmo volume de solução salina (NaCl 140mM; pH 7,4) foi injetado em animais controles.

4.5. Protocolo de treinamento físico

Animais dos grupos CT e MT foram submetidos a um protocolo de treinamento de corrida de intensidade moderada em esteira, que iniciou 24h após a aplicação da monocrotalina ou salina, conforme previamente descrito (60). O treinamento consistiu de corrida em uma esteira rolante, 5 dias por semana (segunda a sexta-feira), 60 minutos por dia, durante 24 dias. Cada sessão incluiu períodos de aquecimento (5 min; velocidade: 20 %), treino (50 min; velocidade: 60 % da VMC) e desaquecimento (5 min; velocidade: 20 % da VMC). Na primeira semana, a velocidade inicial foi de 5m/min e incrementos de 3m/min a cada 3 minutos, até atingir 60% da VMC. No 12º dia de treinamento as intensidades de corrida foram reajustadas, de acordo com a VMC obtida no teste de tolerância ao exercício.

4.6. Ecocardiografia

No 24º dia após a aplicação da monocrotalina ou da salina o exame ecocardiográfico foi realizado para avaliar a resistência da artéria pulmonar. 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/s ajustados de acordo com a frequência cardíaca. O fluxo da artéria pulmonar foi obtido por meio do Doppler pulsátil. As imagens foram coletadas de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia e armazenadas para posterior análise (66). Foram avaliados o tempo de aceleração do fluxo na artéria pulmonar (TA) e o tempo de ejeção (TE). Posteriormente, a razão TA/TE foi calculada.

4.7. Coleta de amostras de tecidos

Foram utilizados 6 animais de cada grupo para as análises histomorfométricas. Os animais do grupo MS sofreram eutanásia quando manifestaram sinais clínicos de falha do ventrículo direito (ex. perda de 10 g do peso corporal de um dia para outro e/ou dispneia; cianose; letargia), que aconteceu, em média, aos 32 dias após a aplicação da monocrotalina. Os seus respectivos controles (grupo CS) sofreram eutanásia no mesmo dia. Os animais do grupo MT e CT sofreram eutanásia 48 horas após a última sessão de treinamento, na média de sobrevivência do grupo MS (32 dias após a aplicação da monocrotalina). Todos os animais sofreram eutanásia por decapitação, sem utilização de anestesia prévia, usando-se uma guilhotina própria para o uso em roedores (Insight EB 271). Este método foi utilizado, pois não está relacionado com a percepção da dor e não contamina o material biológico a ser utilizado (67). Após eutanásia, o coração e os pulmões foram dissecados, pesados e fragmentos dos ventrículo e do pulmão direitos foram colocados em fixador histológico (formaldeído 10% p / v recém-preparado em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2), por 48 horas.

4.8. Isolamento de miócitos do ventrículo direito

Foram utilizados 6 animais de cada grupo para as análises de dimensões, contração celular e cálcio intracelular transiente. O isolamento dos miócitos do ventrículo direito foi realizado conforme descrito anteriormente (68). Após a eutanásia, realizou-se uma toracotomia e o coração foi rapidamente removido, pesado em balança de precisão (modelo AG 200, Gehaka, Brasil) e lavado em solução básica contendo 750 mM de CaCl_2 (Solução A, item 4.8.1) para retirar o excesso de sangue antes da perfusão das soluções de isolamento.

Após este procedimento, o coração foi transferido para uma placa de petri, a aorta ascendente foi fixada com um fio de sutura em uma agulha de aço inoxidável modificada (cânula), e o coração isolado foi colocado em um sistema de perfusão (*Langendorff* adaptado) e perfundido com a solução de isolamento (Solução A, item 4.8.1), em um fluxo constante até que os vasos coronários estivessem limpos.

Em seguida, trocou-se a solução de canulação para solução livre de Ca^{2+} contendo 0,1 mM de ácido tetracético etilenoglicol (EGTA) (Solução B, item 4.8.1), durante 6 minutos, para o rompimento dos discos intercalares entre os cardiomiócitos. Posteriormente, o coração foi perfundido com a solução contendo 30 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de colagenase tipo II (Worthington, EUA), 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}$ de protease e 100 μM de CaCl_2 (Solução C, item 4.8.1), durante 10 minutos, para destruição das fibras extracelulares. Todas as soluções utilizadas no procedimento de isolamento foram oxigenadas (O_2 100% – White Martins, Brasil) e mantidas em temperatura de 37°C. Ao final da perfusão os ventrículos foram separados dos átrios e pesados em balança de precisão (Gehaka – Brasil, modelo AG 200). O ventrículo direito foi removido, pesado e colocado em frasco contendo solução enzimática (Solução C, item 4.8.1). O frasco foi agitado moderadamente durante 5 minutos, em “banho-maria” à temperatura de 37°C, sendo o tecido cardíaco oxigenado (O_2 100% – White Martins, Brasil). Em seguida, o conteúdo do frasco foi filtrado e centrifugado (3000 rpm) por 10 segundos. O sobrenadante foi removido e os cardiomiócitos suspensos na solução básica contendo 750 mM de CaCl_2 . Esse processo foi repetido duas vezes. Os cardiomiócitos foram armazenados em refrigerador para as análises, que foram feitas em até quatro horas após o isolamento.

4.8.1. Composição das soluções

As soluções utilizadas para o isolamento dos cardiomiócitos foram feitas usando-se um litro de uma solução básica com água ultrapura (Milli Q), com a seguinte composição (em mM): NaCl (130) – 7,6 g/l; MgCl₂ (1,43) - 0,28 g/l; KCl (5,4) – 0,4 g/l; (HEPES) (10) – 0,062 g/l; glicose (10) – 1,8 g/l; taurina (20) – 2,38 g/l; e creatina (10) – 1,3 g/l. O pH foi ajustado em 7,4 em temperatura ambiente.

Solução A:

Para fazer a solução de isolamento contendo 750 mM de Ca²⁺, foram adicionados 375 µl de CaCl₂ (1 M) em 500 ml da solução básica.

Solução B:

Para a solução de isolamento livre de Ca²⁺, foram adicionados 250 µl de EGTA (100 mM) em 250 ml da solução básica.

Solução C:

Para a solução enzimática de isolamento, foram adicionados 0,030 g de colagenase e 0,003g de protease em 30 mL da solução básica.

4.8.2. Solução de perfusão-tampão HEPES

Para a mensuração da contratilidade celular e do cálcio intracelular transiente, os miócitos foram banhados com uma solução fisiológica contendo (em mM):

- solução estoque: NaCl (113) – 65,99 g/l; HEPES (5) – 11,9 g/l; NaH₂PO₄ (1) – 1,42 g/l; MgSO₄ (1) – 2,46 g/l; KCl (5) – 3,72 g/L;

- solução sopa: acetato de Na (20) – 16,4 g/100 mL; glicose (10) – 18,1 g/100 mL; e insulina (5 u/L) – 0,5 g/100 mL.

Para fazer um litro da solução de perfusão-tampão HEPES, foram adicionados 100 mL da solução-estoque, 10 mL da solução sopa e 1,8 mL de CaCl₂ (1) a 890 mL de água ultrapura (Milli- Q). Essa solução foi equilibrada para um pH = 7,4 e mantida em temperatura ambiente.

4.9. Mensuração do comprimento, largura e volume celular

Para análise das dimensões dos miócitos isolados do ventrículo direito, foram utilizadas 60 células por grupo. Resumidamente, os miócitos isolados foram acomodados em uma câmara experimental e banhados com solução de perfusão tampão à temperatura ambiente (~25°C). As imagens das células foram capturadas por uma câmera (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada a um microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, EUA) e visualizadas em um monitor de um microcomputador, com aumento de 400x, usando-se lente objetiva de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, EUA). Para tal, utilizou-se um programa de captação de imagens (MVision 5XX, Ionoptix, EUA). O comprimento celular foi determinado medindo-se a imagem da célula gerada no monitor, desde a borda direita até a borda esquerda. A largura celular foi determinada medindo-se a imagem gerada no monitor, desde a borda superior até a borda inferior.

Para a realização das medições do comprimento e da largura dos miócitos cardíacos, utilizou-se uma régua graduada. O sistema foi calibrado de forma que cada centímetro correspondeu a 12 µm. Somente foram escolhidas para as medições, as células que estavam em boas condições, com as bordas (direita/esquerda e superior/inferior) e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxadas em repouso, sem apresentar contrações voluntárias. O volume celular, dado em picolitros, foi calculado usando-se a fórmula proposta por Satoh et al. (1996):

$$\text{Volume (pL)} = \text{comprimento } (\mu\text{m}) \times \text{largura } (\mu\text{m}) \times (7,59 \times 10^{-3} \text{pL}/\mu\text{m}^2)$$

4.10. Mensuração da contração celular

As contrações dos miócitos do VD foram mensuradas por meio de um sistema de detecção de bordas (Ionwizard, Ionoptix, EUA), montado num microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, Japão) equipado com uma lente objetiva de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, EUA), conforme descrito previamente (68). Em resumo, os cardiomiócitos isolados foram acomodados na câmara experimental montada em um microscópio invertido e banhados por solução banhados pela solução de perfusão tampão (solução tampão *HEPES*, item 4.8.2) à temperatura de 37°C. Os

cardiomiócitos foram estimulados externamente na frequência de 5 Hz (10 Volts, duração de 5 ms) usando-se um estimulador elétrico (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, EUA). A imagem do cardiomiócito em avaliação foi capturada por uma câmera (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada ao microscópio invertido, utilizando-se um programa de detecção de imagens (Ionwizard, Ionoptix, EUA - frequência de 240 Hz). Os movimentos de contração e relaxamento do miócito foram capturados pelo sistema de detecção de bordas (Ionwizard, Ionoptix, EUA) e armazenados para análise posterior das propriedades mecânicas. Foram utilizados para os experimentos, somente os cardiomiócitos que estavam em boas condições, com as bordas (direita e esquerda) e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso, sem apresentar contrações involuntárias.

As variáveis analisadas foram: amplitude de contração (variação percentual do comprimento celular em relação ao repouso); tempo até o pico de contração (tempo compreendido desde a estimulação elétrica até a amplitude máxima de contração); tempo até 50% do relaxamento (tempo compreendido desde a amplitude máxima de contração até 50% do relaxamento).

4.11. Mensuração do cálcio intracelular transiente

As medidas do Ca^{2+} intracelular transiente de cardiomiócitos isolados do VD foram realizadas conforme descrito anteriormente (69). Em suma, as medidas foram feitas utilizando-se um microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, EUA) equipado com uma lente objetiva de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, EUA). Os cardiomiócitos isolados foram incubados com o indicador fluorescente de Ca^{2+} , permeável à membrana plasmática, Fura-2 ácido aminopolicarboxílico (Fura-2AM, ThermoFisher, Waltham, EUA). Esse marcador foi preparado em uma solução estoque a base de dimetilsulfóxido – DMSO (50 μg de Fura-2 AM em 50 μl de DMSO). Adicionou-se 5 μl dessa solução em 2 mL de meio celular (células suspensas na solução A – item 4.8.1) contidos em tubo falcon envolvido com folha fina de alumínio. A solução foi agitada em superfície plana por 10 minutos. Em seguida, o tubo foi centrifugado (3.000 rpm), removeu-se o sobrenadante e os cardiomiócitos foram resuspendidos em 2 mL da contendo 750 mM de CaCl_2 (Solução A – item 4.8.1).

Após esse procedimento, o tubo falcon com os cardiomiócitos foi mantido em um refrigerador (5^o C) por 30 minutos. Todo esse procedimento descrito anteriormente

foi realizado sem exposição da solução e células à luz. Após os 30 minutos em refrigerador, o Ca^{2+} intracelular transiente foi medido utilizando-se um sistema de excitação dupla que detecta a fluorescência excitada por luz UV com comprimento de 340 e 380 nm (Ionoptix – EUA), conforme descrito anteriormente (70). Resumidamente, os cardiomiócitos incubados com Fura-2 foram colocados em uma câmara experimental, montada em um microscópio invertido, e foram banhados pela solução de perfusão tampão (solução tampão *HEPES*, item 3.8.2) em temperatura ambiente. O cardiomiócito em avaliação foi posicionado dentro de uma janela ajustável, com bordas aparentes, e estimulados externamente na frequência de 5 Hz (40 Volts, duração de 5 ms) usando-se um estimulador elétrico (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, EUA). A emissão de fluorescência foi detectada entre 340 e 380 nm, por um tubo fotomultiplicador. A fluorescência registrada é a razão entre as excitações de 340 e 380 nm. Foram utilizados somente os cardiomiócitos que estavam em boas condições, com as bordas (direita e esquerda) e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso, sem apresentar contrações involuntárias. Os registros foram sempre feitos até quatro horas após o isolamento dos cardiomiócitos.

As variáveis analisadas foram: amplitude do Ca^{2+} intracelular transiente (340:380 nm); tempo para o pico do Ca^{2+} intracelular transiente (tempo compreendido desde a estimulação elétrica até a fluorescência máxima) e tempo para 50% do decaimento do Ca^{2+} intracelular transiente (tempo compreendido desde a fluorescência máxima até metade do retorno à fluorescência basal).

4.12. Análises histomorfométricas

As análises histomorfométricas dos ventrículo e pulmão direitos foram realizadas conforme descrito previamente por Bozi et al.(71). Em suma, os fragmentos destes órgãos foram submetidos ao processamento histológico de rotina (desidratação, diafanização e infiltração) e embebidos em parafina (71, 72). Em seguida, foram feitos cortes histológicos de 5 μm de espessura utilizando-se um micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045 Multicut, Alemanha).

Para evitar análises repetidas da mesma área histológica, as secções foram avaliadas em semi-séries, usando 1 de cada 50 secções. Foram montadas duas lâminas histológicas por animal, contendo 6 cortes cada. Posteriormente, as secções

foram desparafinadas, reidratadas, coradas com hematoxilina e eosina (H & E) ou com *picrosirius red* seguido por desidratação e diafanização; e as lâminas foram montadas.

Os cortes histológicos corados com H & E foram usados para histopatologia geral (72). As lâminas foram visualizadas e as imagens capturadas usando-se uma câmera digital (Olympus DP 73; Tóquio, Japão) acoplada em microscópio de luz (Olympus BX 53; Tóquio, Japão), por meio do aplicativo Cellsens 1.7 Image Software (Olympus; Tóquio, Japão). Todos os parâmetros foram determinados usando-se uma técnica morfométrica com uma grade com 266 interseções.

A morfologia do ventrículo direito foi examinada com duas orientações diferentes. Nos cortes com orientação transversal (aumento de 40x), analisou-se a área de secção transversa (AST) dos miócitos (73, 74). Para cada animal, foram analisadas 50 células usando-se o software Image - Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics; Silver Spring, USA). Nos cortes com orientação longitudinal (aumento de 20x), foram analisados os percentuais de citoplasma, de núcleo e de vasos sanguíneos, usando-se o software Image J (National Institutes of Health, EUA). Foram analisadas seis imagens aleatórias de cada animal.

A morfologia do pulmão direito (37, 75) foi examinada na orientação transversal (aumento de 20x), para análise do percentual de lúmen alveolar, parede alveolar, lúmen de vaso sanguíneo, parede de vaso sanguíneo, bronquíolo e tecido conjuntivo. As imagens foram analisadas usando-se o software Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, EUA). Foram analisadas seis imagens aleatórias de cada animal. Os parâmetros avaliados foram determinados usando-se a técnica morfométrica, onde uma grade com 266 interseções é sobreposta às imagens e as estruturas de interesse são contadas e os dados expressos em percentagem.

As lâminas coradas por *picrosirius red* (71, 76) foram utilizadas para quantificar as fibras de colágeno tipo I e tipo III. As lâminas foram observadas em microscópio com luz polarizada (Olympus BX 53; Tokio, Japan). Dez imagens do VD e do pulmão foram capturadas, com aumento de 20x, usando-se uma câmera digital (Olympus DP 73; Tokio, Japan) e o aplicativo Cellsens 1.7 Image Software (Olympus; Tokio, Japan). As imagens foram analisadas usando-se o software Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics; Silver Spring, USA). Foram analisadas dez imagens aleatórias de cada animal. Da mesma forma, os parâmetros avaliados foram determinados usando-se a

técnica morfométrica, onde uma grade com 266 interseções é sobreposta às imagens e as estruturas de interesse são contadas. Nestas análises, utilizou-se a ferramenta “*intensity range selection*” para determinar as cores de interesse para as medições, após calibração. As fibras espessas, que sob luz polarizada manifestavam coloração laranja-vermelha, foram consideradas colágeno tipo I, enquanto a coloração azul-verde foi considerada colágeno tipo III (76). A média da área ocupada pelo colágeno foi dividida pela média da área total da imagem e os resultados calculados em percentagem das fibras por área total.

4.13. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. As comparações foram realizadas usando-se o teste de análise de variância (ANOVA) de duas entradas, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey/Fisher ou o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn, conforme apropriado. Foram testados: o efeito da doença (HAP vs. Controle); o efeito do treinamento físico (Treinado vs. Sedentário); e a interação entre os fatores. Para análise dos dados do teste de tolerância ao exercício, utilizou-se a ANOVA de duas entradas para medidas repetidas, seguida do teste *post hoc* de Tukey/Fisher. Foi utilizado o software SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Uma probabilidade de erro alfa de 5% foi considerada.

5. RESULTADOS

5.1. Massa corporal e dos órgãos

Na tabela 1 estão descritos os valores da massa corporal e dos órgãos dos animais dos grupos experimentais. A massa corporal inicial não foi diferente entre os grupos ($p > 0,05$). Houve efeito da doença, independente do fator treinamento, na massa corporal final e na massa do fígado (HAP < Controle, $p < 0,05$), pois os animais que receberam a injeção de monocrotalina apresentaram menor massa corporal final e menor massa do fígado. Não houve efeito do treinamento (treinados = sedentários, $p > 0,05$), independente do fator doença, e não houve interação entre os fatores ($p > 0,05$).

As massas do coração, do ventrículo direito, dos pulmões direito e esquerdo tiveram efeito independente do fator doença (HAP > Controle, $p < 0,05$), pois os animais HAP apresentaram maiores valores, em comparação aos controles. Todavia, o fator treinamento reduziu estes parâmetros (Treinado < Sedentários, $p < 0,05$). Foi observada interação entre os fatores ($p < 0,05$). O grupo MT apresentou valores inferiores de massa do coração, massa do ventrículo direito e massa do pulmão direito e pulmão esquerdo, comparado ao grupo MS. A massa do ventrículo esquerdo não foi afetada pelos tratamentos ($p > 0,05$).

O fator doença, independentemente, aumentou (HAP > Controle, $p < 0,05$) os valores das razões da massa do coração/massa corporal, ventrículo direito/massa corporal, ventrículo direito/massa coração, ventrículo direito/ventrículo esquerdo + septo, pulmão direito/massa corporal e pulmão esquerdo/massa corporal. Entretanto, com exceção da razão do ventrículo direito/massa coração, o treinamento, independentemente, reduziu estes parâmetros (Treinado < Sedentário, $p < 0,05$). Houve interação entre os fatores ($p < 0,05$), pois o grupo MT apresentou menores valores das razões, comparado ao grupo MS.

Tabela 1. Massa corporal e dos órgãos.

Parâmetros	CS	CT	MS	MT
Massa corporal inicial (g)	238,50 ± 4,66	239,25 ± 4,31	238,25 ± 7,30	239,41 ± 3,81
Massa corporal final (g)	343,83 ± 10,04	332,92 ± 11,16	275,58 ± 10,72 ^a	297,50 ± 5,73
Massa Coração (g)	1,29 ± 0,05	1,18 ± 0,04	1,42 ± 0,07 ^a	1,14 ± 0,05 ^b
Massa VD (g)	0,20 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,36 ± 0,05 ^a	0,26 ± 0,02 ^b
Massa VE + septo (g)	0,89 ± 0,07	0,87 ± 0,05	0,81 ± 0,07	0,72 ± 0,05
Massa Pulmão direito (g)	1,31 ± 0,07	1,35 ± 0,11	2,23 ± 0,11 ^a	1,75 ± 0,12 ^b
Massa Pulmão esquerdo (g)	0,72 ± 0,04	0,64 ± 0,03	1,14 ± 0,07 ^a	0,96 ± 0,05 ^b
Massa Fígado (g)	13,18 ± 0,43	12,59 ± 0,59	10,48 ± 0,70 ^a	11,69 ± 0,31
Coração/massa corporal (mg/g)	3,78 ± 0,19	3,55 ± 0,05	5,45 ± 0,26 ^a	3,84 ± 0,16 ^b
VD/massa corporal (mg/g)	0,59 ± 0,03	0,77 ± 0,07	1,33 ± 0,17 ^a	0,87 ± 0,07 ^b
VD/ massa coração (mg/g)	0,16 ± 0,00	0,21 ± 0,02 ^a	0,23 ± 0,02 ^a	0,22 ± 0,01
VD/ VE + septo (mg/mg)	0,23 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,47 ± 0,05 ^a	0,35 ± 0,01 ^b
Pulmão direito/massa corporal (g/g)	3,80 ± 0,16	4,13 ± 0,37	8,17 ± 0,38 ^a	5,91 ± 0,44 ^b
Pulmão esquerdo/massa corporal (g/g)	2,11 ± 0,12	1,93 ± 0,09	4,21 ± 0,28 ^a	3,23 ± 0,18 ^b
Fígado/massa corporal (g/g)	38,33 ± 0,56	37,67 ± 0,81	37,88 ± 1,93	39,26 ± 0,50

Os dados são média ± erro padrão da média. CS: controle sedentário; CT: controle treinado; MS: monocrotalina sedentário; MT: monocrotalina treinado; VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo. ANOVA two-way com *post hoc* de Tukey (massa corporal inicial e final, massa do coração, massa do VE + septo, massa dos pulmões e suas razões). Kruskal-Wallis com *post hoc* Dunn (VD e suas razões, fígado /massa corporal). **a** ($p < 0,05$) comparado ao grupo CS. **b** ($p < 0,05$) comparado ao grupo MS.

5.2. Tolerância ao esforço físico

Na figura 2, estão representados os resultados do teste de tolerância ao exercício. Não houve efeito, independente, dos fatores doença (HAP = Controle, $p > 0,05$) e treinamento (Treinado = Sedentário, $p > 0,05$) no tempo total (Fig. 2 A), velocidade de corrida (Fig. 2 B) e na distância de corrida (Fig. 2 C) antes da injeção monocrotalina ou salina (pré tratamento).

Todavia, após os tratamentos observou-se efeito, independente, da doença (HAP < Controle, $p < 0,05$), pois esta reduziu os referidos parâmetros. Porém, o treinamento, independentemente, aumentou os parâmetros (Treinado > Sedentário, $p < 0,05$). Houve interação entre os fatores ($p < 0,05$), pois o grupo MT apresentou maior tempo total, velocidade de corrida e distância de corrida, comparado ao grupo MS. Além disso, quando comparados os valores do tempo, da distância e da velocidade pré aplicação com respectivos valores pós tratamentos, foi observado que os grupos sedentários apresentaram valores menores ($p < 0,05$).

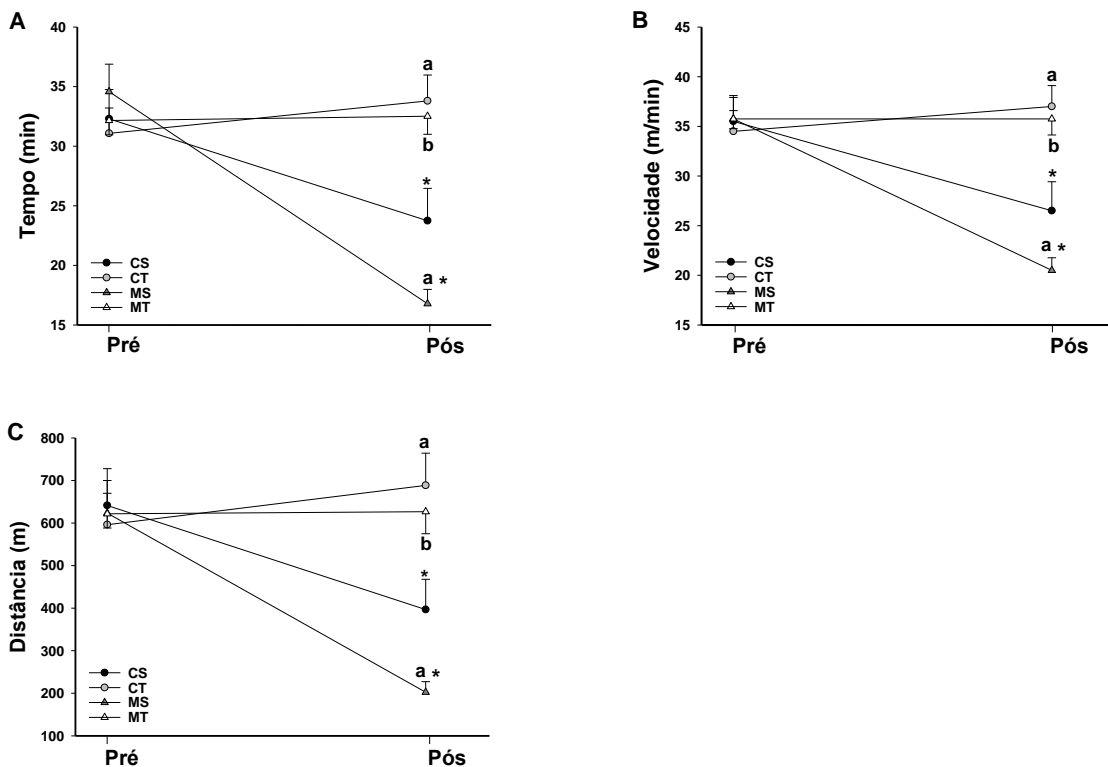


Figura 2. Dados do teste de tolerância ao esforço físico. (A) Tempo de corrida em esteira até a fadiga; (B) Velocidade de corrida em esteira até a fadiga; (C) Distância

corrida em esteira até a fadiga. Pré, 1 dia pré-injeção de monocrotalina ou solução salina. Pós, 25º dias pós-injeção de monocrotalina ou solução salina. Os dados são média \pm erro padrão da média (12 animais por grupo). CS: controle sedentário; CT: controle treinado; MS: monocrotalina sedentário; MT: monocrotalina treinado. ANOVA two way com *post hoc* de Tukey. ANOVA two way de medidas repetidas. **a** ($p < 0,05$) comparando ao grupo CS. **b** ($p < 0,05$) comparado ao grupo MS.* ($p < 0,05$) comparando pré e pós tratamentos.

5.3. Hemodinâmica e resistência da artéria pulmonar

A figura 3 apresenta resultados da resistência da artéria pulmonar. No painel A são apresentadas imagens representativas do fluxo da artéria pulmonar obtidas por meio de Doppler de onda pulsátil. Houve efeito, independente, da doença (HAP < Controle, $p < 0,05$) no tempo de aceleração do fluxo na artéria pulmonar (Fig. 3 B), no tempo de ejeção (Fig. 3 C) e na razão TA/TE (Fig. 3 D), pois os animais HAP apresentaram menores valores, em comparação aos controles. Da mesma forma, houve efeito, independente, do treinamento (Treinado > Sedentários, $p < 0,05$) no tempo de aceleração do fluxo na artéria pulmonar, no tempo de ejeção e na razão TA/TE, onde os animais treinados apresentaram maiores valores que os sedentários ($p > 0,05$). Houve interação entre os fatores ($p < 0,05$), pois o grupo MT apresentou maior razão comparado ao grupo MS. Observa-se que a redução da razão TA/TE representa aumento da resistência da artéria pulmonar e vice-versa.

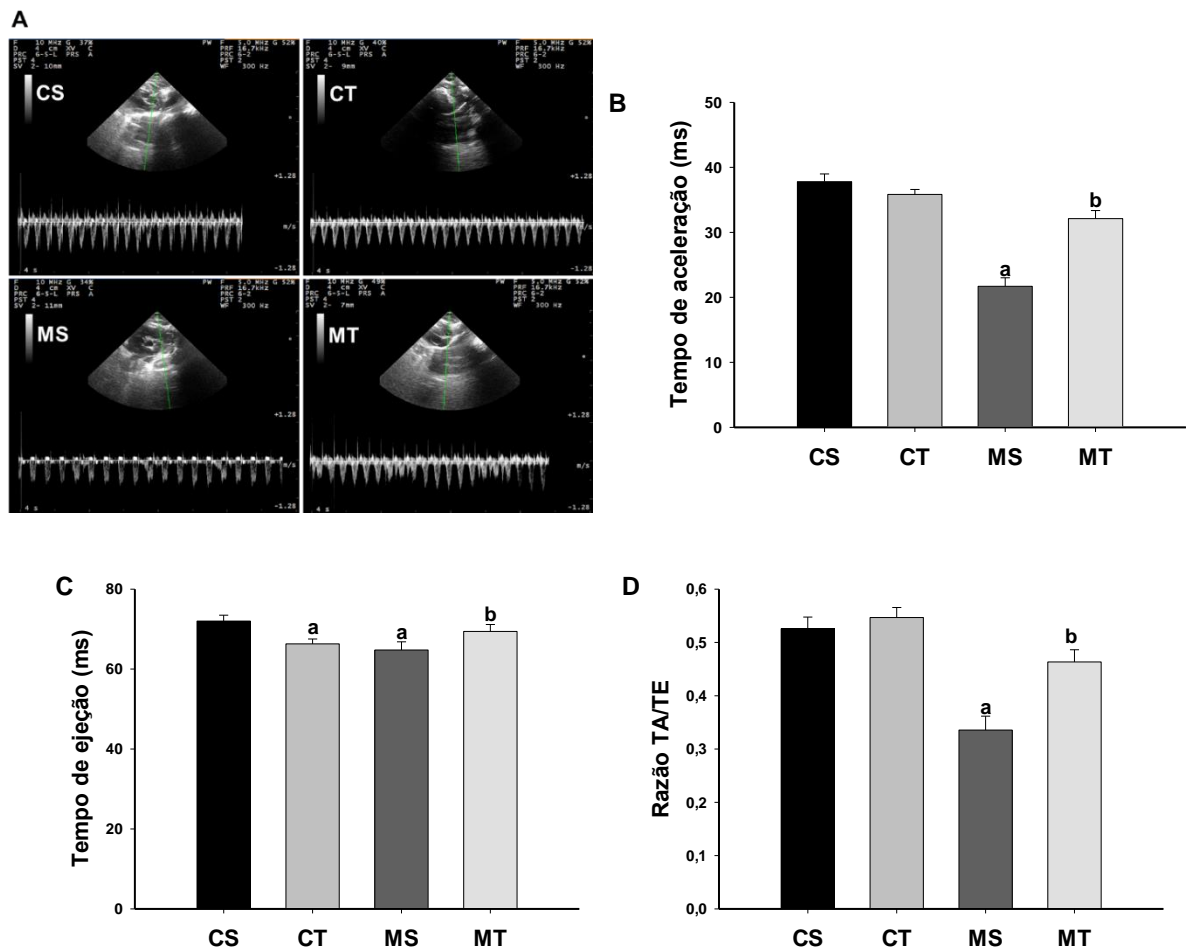


Figura 3. Resistência da artéria pulmonar. (A) Imagens representativas do fluxo da artéria pulmonar. (B) Tempo de aceleração do fluxo na artéria pulmonar (TA). (C) Tempo de ejeção (TE). (D) Razão tempo de aceleração/tempo (TA/TE) medido no 24º dia pós-injeção de monocrotalina e solução salina. Os dados são média \pm erro padrão da média (10-12 animais por grupo). CS: controle sedentário; CT: controle treinado; MS: monocrotalina sedentário; MT: monocrotalina treinado. ANOVA two way com *post hoc* de Tukey. **a** ($p < 0,05$) comparando ao grupo CS. **b** ($p < 0,05$) comparando ao grupo MS.

5.4. Contração celular

A figura 4 apresenta os dados da contratilidade de cardiomiócitos isolados do ventrículo direito. Observa-se que não houve efeito, independente, do fator doença

(HAP = Controle, $p > 0,05$), nem do treinamento (Sedentário = Treinado $p > 0,05$) na amplitude de contração (Fig. 4 A).

Quando ao tempo para o pico de contração (Fig. 4 B), houve efeito, independente, do fator doença (HAP > Controle, $p < 0,05$), onde cardiomiócitos dos animais HAP apresentaram maior tempo para o pico em relação aos dos animais controles. Entretanto, o fator treinamento, independentemente, reduziu este tempo (Treinado < Sedentário, $p < 0,05$). Houve interação entre os fatores ($p < 0,05$), pois o grupo MT apresentou menor tempo para o pico que o grupo MS.

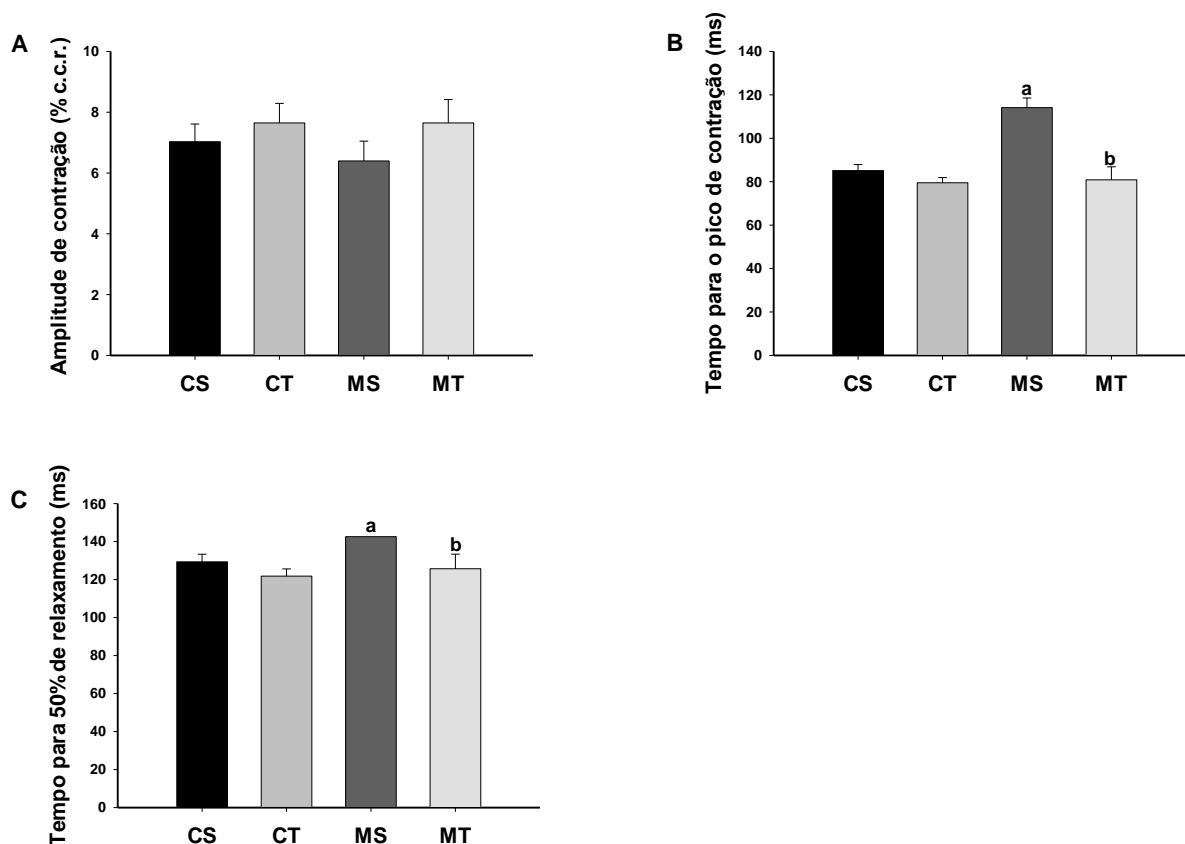


Figura 4. Contração em miócitos isolados do ventrículo direito. (A) Amplitude de contração. (B) Tempo para o pico de contração. (C) Tempo para 50% de relaxamento. Os dados são média \pm erro padrão da média (13-24 células de 6 animais por grupo). CS: controle sedentário; CT: controle treinado; MS: monocrotalina sedentário; MT: monocrotalina treinado. ANOVA two way com *post hoc* de Tukey. **a** ($p < 0,05$) comparando ao grupo CS. **b** ($p < 0,05$) comparado ao grupo MS.

Em relação ao tempo para 50% do relaxamento (Fig. 4 C), houve efeito, independente, do fator doença (HAP > Controle, $p < 0,05$), pois os animais HAP apresentaram maior tempo, em comparação aos controles. Da mesma forma, houve efeito, independente, do fator treinamento (Treinado < Sedentário, $p < 0,05$). Houve interação entre os fatores ($p < 0,05$), pois o grupo MT apresentou menor tempo para 50% do relaxamento que o grupo MS.

5.5. Cálcio intracelular transiente

A figura 5 apresenta os dados do Ca^{2+} intracelular transiente de cardiomiócitos isolados do ventrículo direito. Observa-se que houve efeito, independente, do fator doença (HAP < Controle, $p < 0,05$) na amplitude do Ca^{2+} intracelular transiente, pois, nos animais com HAP a amplitude foi menor comparada a dos controles (Fig. 5 A). Houve efeito, independente, do fator treinamento (Treinado > Sedentário, $p < 0,05$), onde os treinados apresentaram maior amplitude, em comparação aos sedentários. Houve interação entre os fatores ($p < 0,05$), pois o grupo MT apresentou maior amplitude que o grupo MS.

O tempo para o pico do Ca^{2+} intracelular transiente (Fig. 5 B) teve efeito, independente, do fator doença (HAP > Controle, $p < 0,05$), pois, nos cardiomiócitos dos animais HAP, essa variável apresentou maior valor, comparado aos controles. Houve efeito, independente, do fator treinamento (Treinado < Sedentário, $p < 0,05$), pois os animais treinados apresentaram menor valor que os sedentários. Houve interação entre os fatores ($p < 0,05$), onde o grupo MT apresentou menor tempo para o pico, comparado ao grupo MS.

Quanto ao tempo para 50% de decaimento do Ca^{2+} intracelular transiente (Fig. 5 C), também houve efeito, independente, do fator doença (HAP > Controle, $p < 0,05$), pois os animais com HAP apresentaram valores superiores, comparados aos dos controles. Houve efeito, independente, do fator treinamento (Treinado < Sedentário, $p < 0,05$), pois os animais treinados apresentaram menor valor que os sedentários. Houve interação entre os fatores ($p < 0,05$), onde o grupo MT apresentou menor tempo para 50% de decaimento comparado ao grupo MS.

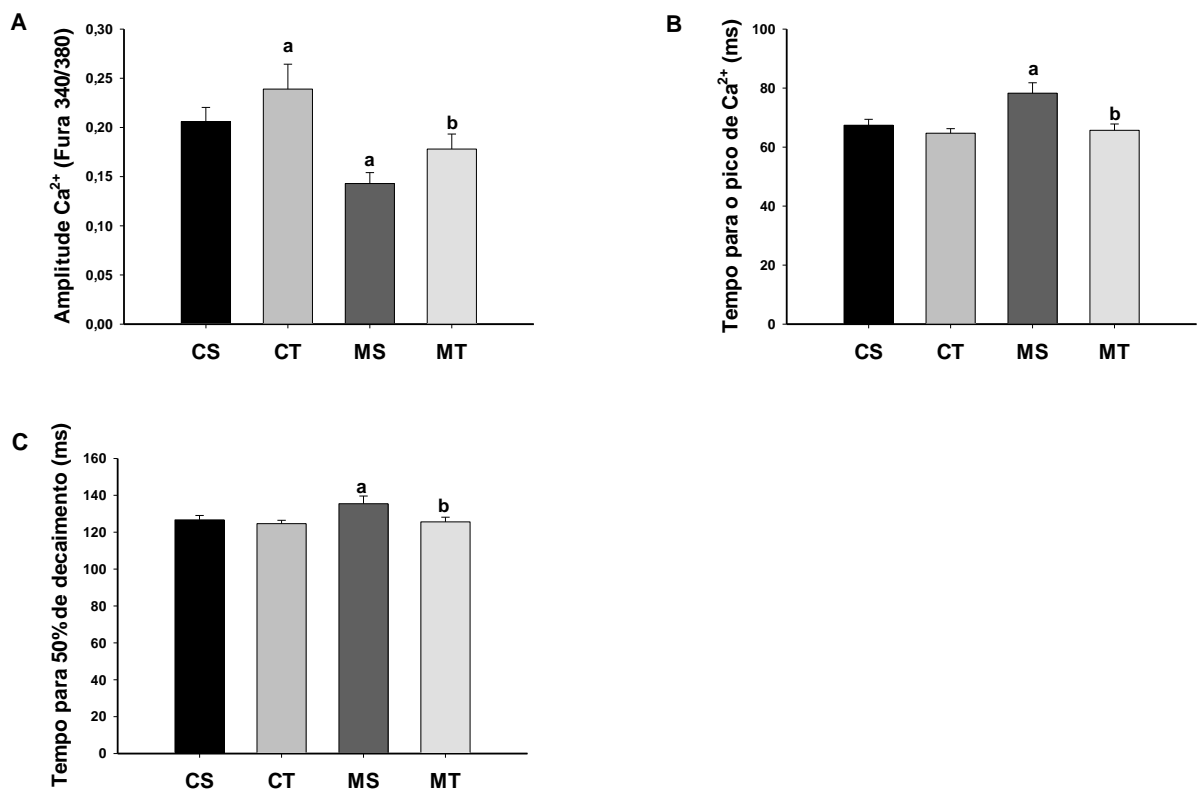


Figura 5. Cálcio intracelular transiente em miócitos isolados do ventrículo direito. (A) Amplitude de transiente. (B) Tempo para o pico de transiente. (C) Tempo para 50% de relaxamento. Os dados são média \pm erro padrão da média (11-57 células de 6 animais por grupo). CS: controle sedentário; CT: controle treinado; MS: monocrotalina sedentário; MT: monocrotalina treinado. ANOVA two way com *post hoc* de Tukey. **a** ($p < 0,05$) comparando ao grupo CS. **b** ($p < 0,05$) comparado ao grupo MS.

5.6. Dimensões dos miócitos do ventrículo direito

a) Área de secção transversa

Os dados da secção transversa dos miócitos do ventrículo direito estão apresentados na figura 6. O painel A apresenta fotomicrografias histológicas do VD com orientação transversal. Houve efeito independente do fator doença (HAP > Controle, $p < 0,05$) na área de secção transversa dos miócitos do VD (Fig. 6 B), pois, esta foi maior nos animais com HAP que nos controles. Houve também efeito

independente do fator treinamento (Treinado < Sedentários, $p < 0,05$), onde os animais treinados apresentaram menor área de secção transversa que os sedentários. Houve interação entre os fatores ($p < 0,05$).

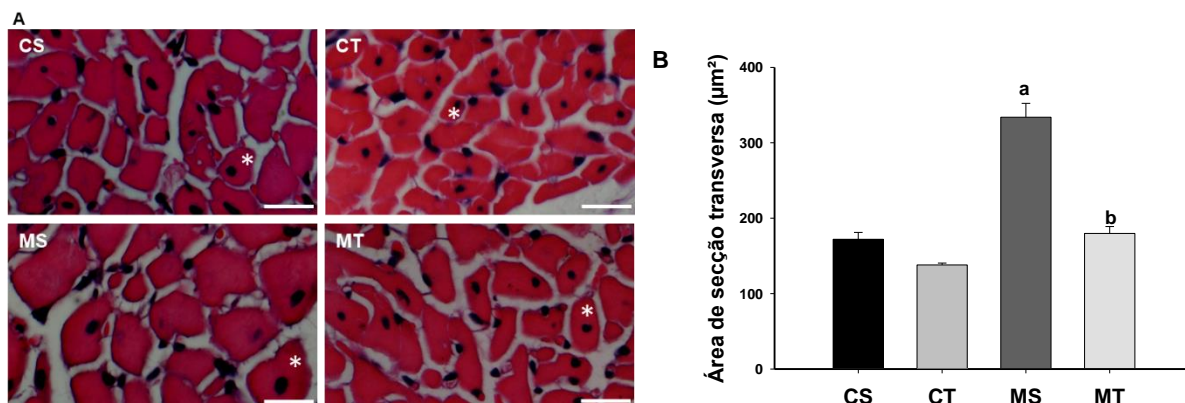


Figura 6. Área de secção transversa de miócitos do ventrículo direito. (A) Fotomicrografias representativas do ventrículo direito, corado com H & E. Asterisco indica cardiomiócitos. Barra = 20 μm. (B) Porcentagem de área de secção transversa de miócitos do VD. Os dados são média ± erro padrão da média (10 lâminas por animal de 6 animais por grupo). CS: controle sedentário; CT: controle treinado; MS: monocrotalina sedentário; MT: monocrotalina treinado. ANOVA two way com *post hoc* de Tukey. **a** ($p < 0,05$) comparado ao grupo CS. **b** ($p < 0,05$) comparado ao grupo MS.

b) Largura, comprimento e volume celular

Os dados das dimensões dos miócitos isolados do ventrículo direito estão apresentados na figura 7. Não foram observados efeitos da doença (HAP = Controle, $p > 0,05$), nem do treinamento (treinado = sedentários, $p > 0,05$) no comprimento dos cardiomiócitos (Fig. 7 A). Todavia, houve efeito, independente, da doença (HAP > Controle, $p < 0,05$) na largura (Fig. 7 B), razão comprimento/largura (Fig. 7 C) e volume dos miócitos (Fig. 7 D), pois os animais HAP apresentaram maior largura, volume e menor razão comprimento/largura, comparados ao que os controles. Também houve efeito, independente, do treinamento (treinado < sedentários, $p < 0,05$) nessas variáveis, onde os animais treinados apresentaram menor largura, volume e maior razão comprimento/largura, comparados ao que os sedentários. Observou-se também

interação entre os fatores ($p < 0,05$), o grupo MT apresentou menor largura, volume e maior razão comprimento/largura, comparado ao grupo MS.

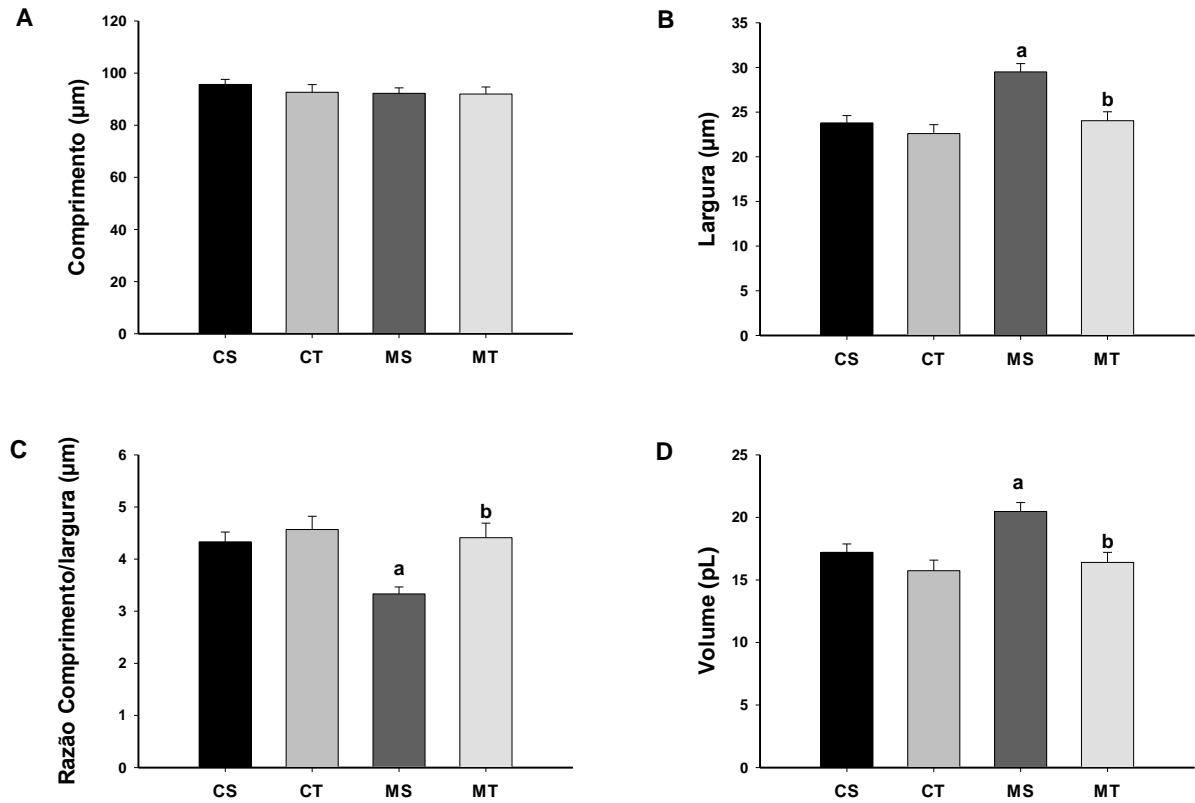


Figura 7. Largura, comprimento e volume celular de miócitos isolados do ventrículo direito. (A) Comprimento celular. (B) Largura celular. (C) Razão comprimento/largura celular. (D) Volume celular. Os dados são média \pm erro padrão da média (60 células de 6 animais por grupo). CS: controle sedentário; CT: controle treinado; MS: monocrotalina sedentário; MT: monocrotalina treinado. ANOVA two way com *post hoc* de Tukey (comprimento). Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn (largura, largura/comprimento e volume). **a** ($p < 0,05$) comparando ao grupo CS. **b** ($p < 0,05$) comparado ao grupo MS.

5.7. Proporções histomorfométricas entre os elementos teciduais dos ventrículo e pulmão direitos

A figura 8 apresenta fotomicrografias do ventrículo direito com orientação longitudinal. Observa-se no painel A, corte histológico do ventrículo direito corado por hematoxilina-eosina, as fibras musculares cardíacas apresentam vasos sanguíneos e núcleos elípticos, às vezes com halo claro ao seu redor. Os animais dos grupos controles (CS e CT) mostraram organização e configuração normais dos cardiomiócitos. Diferente do grupo controle (CS), no grupo MS, a doença causou infiltrado inflamatório em diferentes regiões do tecido, coloração não linear do tecido e matriz extracelular desorganizada. Houve um aumento de fibras de colágeno (seta azul – colágeno tipo I; triangulo branco - colágeno tipo III), o que pode ser observado no painel B, no tecido corado com *picro-sirius red*. O contrário, foi observado no grupo MT.

As médias por grupo dos parâmetros histomorfométricos avaliados estão apresentados na tabela 2. Observou-se efeito, independente, da doença (HAP > Controle, $p < 0,05$) no percentual de núcleo, colágeno tipo I, III e colágeno total, pois os animais HAP apresentaram maiores porcentagem, além de uma redução (HAP < Controle, $p < 0,05$) na porcentagem de citoplasma e de colágeno tipo III, em comparação aos controles. Também houve efeito, independente, do treinamento (treinado < sedentários, $p < 0,05$) nessas variáveis, assim como houve interação entre os fatores ($p < 0,05$), pois o grupo MT apresentou menor percentual de núcleo e maior percentual de citoplasma comparado ao grupo MS. Todavia, não foram observado efeito, independente, do treinamento (treinado = sedentários, $p > 0,05$) na porcentagem de colágeno tipo III.

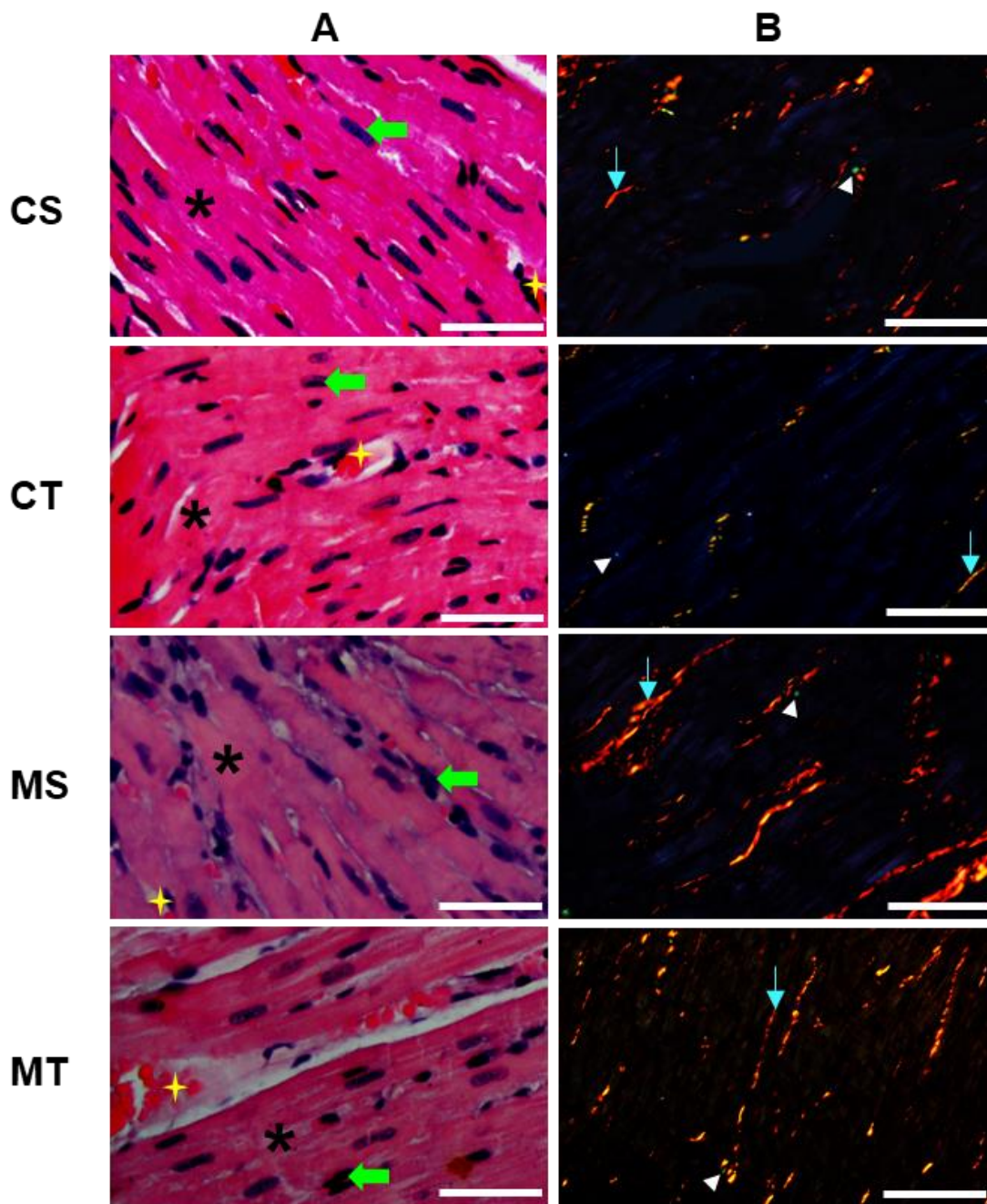


Figura 8. Fotomicrografias representativas do ventrículo direito. (A) Corado com H&E. Barra de escala = 50 μm . (Asterisco) Citoplasma de cardiomiócitos; (Seta verde) núcleo; (Cruz amarela) vasos sanguíneos. (B) Corado com *picosirius red*. Barra de escala = 50 μm . (Seta azul) Colágeno tipo I; (Triângulo branco) Colágeno tipo III. CS: controle sedentário; CT: controle treinado; MS: monocrotalina sedentário; MT: monocrotalina treinado.

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

Parâmetros	CS	CT	MS	MT
Citoplasma (%)	85,65 ± 0,53	88,86 ± 0,65 ^a	80,47 ± 1,13 ^a	87,77 ± 0,59 ^b
Núcleo (%)	13,87 ± 0,53	9,83 ± 0,63 ^a	19,20 ± 1,13 ^a	11,79 ± 0,59 ^b
Vasos sanguíneos (%)	0,46 ± 0,12	1,31 ± 0,34 ^a	0,32 ± 0,11	0,44 ± 0,10
Colágeno Tipo I (%)	7,73 ± 0,73	5,35 ± 1,07	10,12 ± 0,95 ^a	6,03 ± 0,89 ^b
Colágeno Tipo III (%)	1,57 ± 0,26	0,26 ± 0,08 ^a	0,69 ± 0,12 ^a	0,62 ± 0,12
Colágeno Total (%)	9,31 ± 0,71	5,61 ± 1,12 ^a	10,81 ± 0,96 ^a	6,66 ± 0,91 ^b

Os dados são média ± erro padrão da média (6 lâminas por animal de 6 animais por grupo). CS: controle sedentário; CT: controle treinado; MS: monocrotalina sedentário; MT: monocrotalina treinado. ANOVA two way, com *post hoc* de Tukey (citoplasma de miócitos e núcleo). Kruskal-Wallis, com *post hoc* de Dunn (vasos sanguíneos, colágeno tipo I, III e total). **a** ($p < 0,05$) comparando ao grupo CS. **b** ($p < 0,05$) comparando ao grupo MS.

Em relação ao pulmão direito, a figura 9 apresenta fotomicrografias representativas. Observa-se no painel A, corte histológico do pulmão direito corado por hematoxilina-eosina apresentando bronquíolo, vasos sanguíneos, alvéolos. Os grupos controles (CS e CT) apresentaram arquitetura habitual do tecido pulmonar com espaço alveolar bem organizado e septos alveolares de linhas finas. No grupo MS, foi observado rompimento de vasos sanguíneos com hemácias dispersas ao longo do tecido, rompimento de bronquíolos, espaçamento do lúmen alveolar, dobramento do tecido, aumento do septo alveolar e infiltrado inflamatório. O tecido pulmonar do grupo MT apresentou uma redução de vasos e bronquíolos rompidos, dobramento do tecido, septo alveolar, e infiltrado inflamatório em relação ao grupo MS.

Observa-se no painel B, no tecido corado com *picrosirius red*, a disposição de colágeno em todo o tecido pulmonar, essa disposição é mais evidenciada nos animais do grupo MS, principalmente ao redor dos alvéolos. Por outro lado, essas informações não foram visualizadas no grupo MT, nesses animais, a disposição de colágeno foi reduzida.

As medias dos parâmetros histomorfométricos avaliados, por grupos, estão apresentados na tabela 3. Observou-se efeito, independente, do fator doença ($p < 0,05$), pois, os animais HAP apresentaram menor porcentagem de lúmen alveolar e de vaso sanguíneo, maior percentual de parede alveolar e de vasos sanguíneos e de colágeno tipo I e colágeno total, em comparação aos controles. Houve também efeito, independente, do fator treinamento ($p < 0,05$), pois os animais treinados apresentaram maior porcentagem de lúmen alveolar e de vaso sanguíneo, menor percentual de parede alveolar e de colágeno tipo I e colágeno total, em comparação aos sedentários. Observou-se também interação entre os fatores ($p < 0,05$), pois, o grupo MT apresentou maior porcentual de lúmen alveolar, de lúmen do vaso sanguíneo, menor percentual de parede alveolar e de colágeno comparado ao grupo MS. Não foi observado efeito dos fatores doença (HAP = Controle, $p > 0,05$) e treinamento (treinado = sedentários, $p > 0,05$) no percentual de bronquíolo, de tecido conjuntivo e colágeno tipo III.

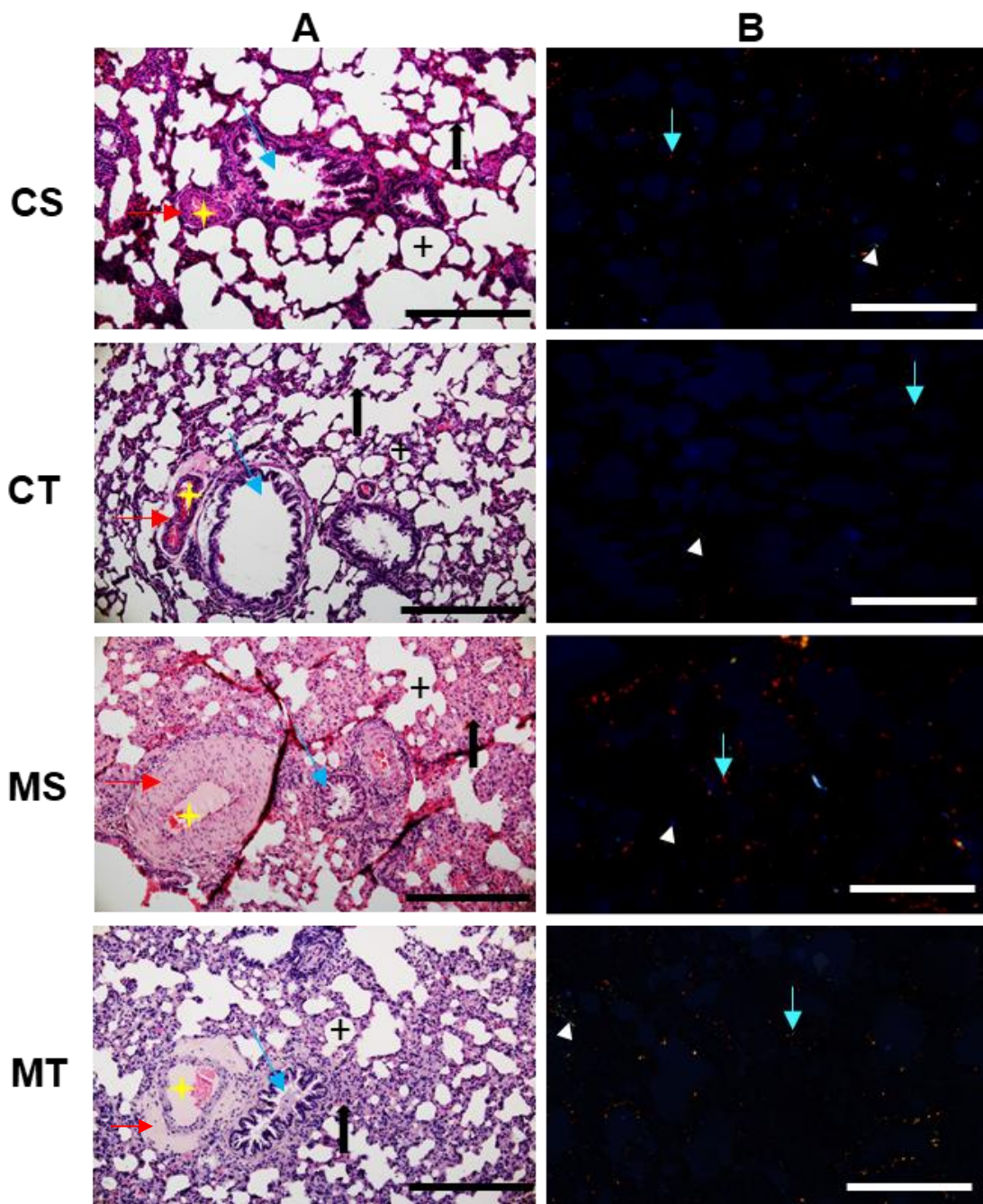


Figura 9. Fotomicrografias representativas do pulmão direito. (A) Corte histológico corado com H & E. Barra de escala = 100 μ m. (Seta vermelha) parede dos vasos sanguíneos; (Seta azul) bronquíolo; (Cruz amarela) lúmen dos vasos sanguíneos; (Seta preta) parede alveolar; (Cruz preta) lúmen alveolar (B) Corte histológico corado com *picro-sirius red*. Barra de escala = 50 μ m. (Seta azul) Colágeno tipo I; (Triângulo branco) Colágeno tipo III. CS: controle sedentário; CT: controle treinado; MS: monocrotalina sedentário; MT: monocrotalina treinado.

Tabela 3. Proporção histomorfométrica entre os elementos teciduais do pulmão direito.

Parâmetros	CS	CT	MS	MT
Lúmen alveolar (%)	57,06 ± 2,45	60,25 ± 2,01	25,34 ± 2,03 ^a	38,24 ± 2,59 ^b
Parede alveolar (%)	34,03 ± 2,45	31,96 ± 2,09	61,04 ± 2,61 ^a	50,58 ± 2,79 ^b
Lúmen vaso sanguíneo (%)	1,06 ± 0,33	1,78 ± 0,32	0,66 ± 0,20 ^a	1,63 ± 0,21 ^b
Parede vaso sanguíneo (%)	2,02 ± 0,45	2,07 ± 0,43	5,39 ± 0,88 ^a	2,91 ± 0,70
Bronquíolo (%)	3,37 ± 0,95	2,54 ± 0,75	2,11 ± 1,76	2,56 ± 0,79
Tecido conjuntivo (%)	2,46 ± 0,48	1,49 ± 0,32	5,40 ± 1,49 ^a	4,03 ± 1,05
Colágeno Tipo I (%)	6,20 ± 1,02	2,59 ± 0,52 ^a	9,95 ± 1,12 ^a	4,40 ± 0,61 ^b
Colágeno Tipo III (%)	0,07 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,10 ± 0,04
Colágeno Total (%)	6,17 ± 1,03	2,64 ± 0,53 ^a	10,07 ± 1,13 ^a	4,43 ± 1,24 ^b

Os dados são média ± erro padrão da média da média (6 lâminas por animal de 6 animais por grupo). CS: controle sedentário; CT: controle treinado; MS: monocrotalina sedentário; MT: monocrotalina treinado. ANOVA two way com *post hoc* de Tukey (parede e lúmen alveolar). Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn (parede e lúmen de vasos sanguíneo, bronquíolo, tecido conjuntivo, colágeno tipo I, III e total). **a** ($p < 0,05$) comparado ao grupo CS. **b** ($p < 0,05$) comparado ao grupo MS.

6. DISCUSSÃO

Os objetivos deste estudo foram verificar os efeitos do treinamento aeróbico contínuo de intensidade moderada sobre a hemodinâmica e a resistência da artéria pulmonar, a estrutura dos ventrículo e pulmão direitos e sobre a função contrátil e o Ca^{2+} intracelular transiente em miócitos isolados do ventrículo direito de ratos durante o desenvolvimento da HAP induzida por monocrotalina. Os principais achados foram que este tipo de treinamento físico aumentou a tolerância ao esforço físico, preveniu o aumento da resistência da artéria pulmonar, a progressão dos prejuízos da hipertensão arterial pulmonar na contração celular (ex. redução do tempo para o pico e 50% de relaxamento) e no cálcio intracelular transiente (ex. aumento da amplitude e redução do tempo para o pico e 50% de relaxamento) em cardiomiócitos isolados do ventrículo direito. Ainda, preveniu a remodelação adversa do ventrículo direito (ex. redução da área de secção transversa, largura, volume e percentual de colágeno) e do pulmão direito (ex. aumento do lúmen alveolar e vascular, redução da parede alveolar e colágeno).

6.1. Massa corporal e dos órgãos

A dose de monocrotalina administrada causou um menor ganho de massa corporal nos animais durante o período experimental. De acordo com Zimmer et al.(60), este menor ganho de massa corporal gerado pela monocrotalina é uma consequência da toxicidade do seu metabolismo hepático nas primeiras semanas. Esta toxidade pode ter prejudicado o ganho de peso, em função de que na hipertensão arterial pulmonar, os glóbulos vermelhos aumentam o transporte de metabólitos reativos da monocrotalina do fígado para o pulmão, causando lesão endotelial nos pulmões, (77) o que acarretará uma redução do fluxo sanguíneo com nutrientes para o organismo. Estudos prévios utilizando monocrotalina como modelo experimental, relatam uma redução na massa corporal final dos animais (78).

A injeção de monocrotalina também levou ao aumento da massa do coração, do ventrículo direito e das razões: VD/massa corporal, VD/ massa coração e VD/ VE + septo, indicando hipertrofia do miocárdio e do ventrículo direito. A hipertrofia do ventrículo direito, na HAP, ocorre porque o ventrículo é submetido a uma sobrecarga

pressórica imposta pelo aumento da resistência da artéria pulmonar (45). Assim, esta hipertrofia é uma resposta compensatória que ocorre a partir do 14º dia após a indução do monocrotalina em resposta à progressão da HAP (60). Processos multifatoriais complexos nas arteríolas resultam em hipertrofia (11, 25) que, a longo prazo, está associada ao remodelamento adverso, tanto no coração (79), quanto no pulmão (80), ocasionando uma disfunção contrátil progressiva e falha cardíaca.

O treinamento aeróbico contínuo de intensidade moderada, por sua vez, atenuou a hipertrofia ventricular direita no grupo MT. Resultados semelhantes foram apresentados por Souza-Rabbo et al.(43) em um estudo experimental e por Ahmed et al.(78) em um ensaio clínico. Nogueira-Ferreira et al. (44), observaram que 4 semanas de treinamento aeróbico preveniu a hipertrofia do VD por ter melhorado a hemodinâmica cardíaca (ex.: diminuição da pressão sistólica e prevenção da disfunção diastólica do VD) e reduzido o remodelamento da artéria pulmonar (devido a diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatória, ex: TWEAK), isso está relacionado à redução da resistência da artéria pulmonar.

A monocrotalina aumentou a razão pulmão direito/massa corporal e pulmão esquerdo/massa corporal, possivelmente devido ao remodelamento vascular associado ao aumento na resistência da artéria pulmonar. Este remodelamento pode ser indicado pelo aumento de parede alveolar observado. Wang et al. (81) relatam que o peso pulmonar elevado na hipertensão arterial pulmonar ocorre em consequência do aumento da parede alveolar. No presente estudo, o treinamento físico aplicado reduziu a razão pulmão direito/massa corporal e pulmão esquerdo/massa corporal. A redução de parede alveolar observada ajuda a explicar a redução nessas razões.

6.2. Tolerância ao esforço físico

A tolerância ao esforço físico reduziu-se de forma similar em ambos os grupos sedentários (CS; MS) ao longo do período experimental, o que ficou evidente com os dados do tempo de corrida, da velocidade de corrida e da distância percorrida durante o teste de esforço físico até a fadiga. Isto indica que a injeção de monocrotalina não influenciou esta queda na tolerância ao esforço físico ao logo do tempo avaliado.

O treinamento aeróbico contínuo de intensidade moderada mostrou-se capaz de manter tolerância ao esforço físico dos animais de ambos os grupos treinados (MT e CT) de forma similar ao longo do período experimental. Este resultado indica que a tolerância ao esforço físico não deteriorou com a injeção de monocrotalina e corrobora aqueles de estudos anteriores, observados indivíduos com HAP, tanto humanos (53, 82) quanto animais (13, 34). Embora, neste estudo, alterações nos músculos esqueléticos não foram avaliadas, este efeito sobre a tolerância ao esforço físico pode ser explicado, em parte, pelos efeitos benéficos induzidos pelo treinamento aeróbico contínuo no músculo esquelético, evitando a perda da função muscular, conforme demonstrado por Moreira-Goncalves et al. (34). Além disso, estudos anteriores observaram que o treinamento físico aeróbico foi capaz de melhorar estrutura e função cardíaca do ventrículo direito (62, 82), reatividade pulmonar (83) e eficácia da troca gasosa pulmonar e prevenção da hipoxemia (84). Ainda, Brow et al.(85) demonstraram que 6 semanas de treinamento intervalado de alta intensidade promove uma melhora na capacidade aeróbia de ratos, devido ao aumento da expressão de eNOS pulmonar endógena, o que está diretamente relacionado ao aumento da produção de NO e, conseqüentemente, o relaxamento arterial dependente de NO, ambos tipicamente comprometidos na HAP (85). De acordo com Souza-Rabbo et al.(43), a corrida replica movimentos naturais para os ratos.

6.3. Hemodinâmica e resistência da artéria pulmonar

A capacidade do ventrículo direito em adaptar-se a um aumento progressivo da resistência vascular pulmonar é o principal determinante da capacidade funcional e da taxa de sobrevivência dos pacientes com HAP (20). No presente estudo, observou-se que 24 dias após aplicação de monocrotalina o grupo MS apresentou uma redução do tempo de aceleração do fluxo na artéria pulmonar (TA), do tempo de ejeção (TE) e da razão TA/TE, o que resultou em um aumento na resistência da artéria pulmonar, estimada pela diminuição da razão TA/TE, em relação ao grupo CS. Schober e Baade (86) relatam que a redução do tempo de aceleração do fluxo na artéria pulmonar, na doença, ocorre devido ao aumento da resistência que manifesta precocemente no leito vascular pulmonar. Devido diferenças na pós carga, o fluxo sanguíneo aórtico e pulmonar normal diferem morfológicamente e o tempo de ejeção tende a ser maior no

fluxo pulmonar (86). Além disso, o tempo de ejeção pode ser afetado pelo deslocamento anatômico que ocorre em pacientes com hipertensão arterial pulmonar no estágio avançado da doença (87). O aumento na resistência da artéria pulmonar é característico do modelo de HAP utilizado, pois gera uma sobrecarga e, conseqüentemente, o remodelamento patológico do ventrículo direito (79). Este aumento da resistência vascular na HAP tem sido associado ao aumento local de vasoconstritores, tais como endotelina-1 e tromboxano; e à diminuição de vasodilatadores, tais como óxido nítrico e prostaciclina, os quais são derivadas do endotélio (11, 18). De fato, indivíduos com HAP apresentam baixos níveis de produção endógena de vasodilatadores, incluindo a enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) e prostanóides (85, 88).

Por outro lado, no presente estudo, o treinamento aeróbico aplicado preveniu o aumento da resistência da artéria pulmonar, que estava reduzida no grupo MT. Isto indica um benefício do treinamento aeróbico contínuo de intensidade moderada, pois reflete uma redução da sobrecarga ao ventrículo direito. Esse resultado se assemelha aos de estudos prévios em modelos de HAP induzida por monocrotalina, que utilizaram o exercício aeróbico (13, 60). Tal efeito do treinamento aeróbico, pode ser explicado, pelo fato de que durante o exercício ocorre um aumento da tensão de cisalhamento mediada pelo fluxo na parede dos vasos, assim como diferentes estímulos humorais, ativando a fosforilação da enzima eNOS e, conseqüentemente, a liberação de NO, resultando ao remodelamento arterial benigno (48, 85, 89). Neste sentido, Brown et al.(85) demonstraram que o treinamento aeróbico (tanto HIIT, quanto de intensidade moderado) previne o remodelamento vascular, sem aumentar os marcadores inflamatórios e de apoptose em ratos com HAP induzida por monocrotalina.

6.4. Contração celular e cálcio intracelular transiente

Quanto à função contrátil de miócitos isolados do VD, observou-se que a amplitude de contração não foi diferente entre os grupos, portanto, não foi afetada pelos tratamentos. Apesar disso, a amplitude do Ca^{2+} intracelular transiente foi reduzida pela injeção de monocrotalina. Isto indica que os prejuízos impostos pela

HAP nestes animais, estão associados à regulação de cálcio intracelular, conforme já demonstrado por estudos anteriores (34, 62, 90).

Outro prejuízo da injeção de monocrotalina foi o prolongamento dos tempos para o pico de contração e para 50% de relaxamento, o que foi acompanhado pelos tempos para o pico e para 50% do decaimento do Ca^{2+} intracelular transiente. O aumento no tempo para o pico de contração, está associado ao maior tempo para o pico do Ca^{2+} intracelular transiente, principalmente em função de atraso na liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) pelos canais receptores de rianodina (RyR2). Quanto ao prolongamento dos tempos para 50% do relaxamento, que está associado ao maior tempo para 50% do decaimento do Ca^{2+} intracelular transiente, isto pode ser explicado, principalmente, pelo atraso na recaptção de Ca^{2+} do citosol para o RS, via SERCA2a (Ca^{2+} ATPase do RS) e PLB (fosfolambam) (91, 92). No presente estudo, as principais proteínas reguladoras de Ca^{2+} nos cardiomiócitos não foram mensuradas. Todavia, estudos prévios (34, 62) demonstraram que as proteínas SERCA2a e RyR2 estavam reduzidas no ventrículo direito de ratos com HAP induzida por monocrotalina.

Mais importante, observou-se, no presente estudo, que o treinamento aeróbico aplicado reduziu os tempos para 50% de relaxamento da contração e para decaimento do Ca^{2+} intracelular transiente. Em animais normais, sem HAP, sabe-se que estas adaptações ao treinamento físico aeróbico ocorrem devido ao aumento da expressão da SERCA2a, FLB, RyR2 e dos canais NCX nos miócitos cardíacos (90). Em animais com HAP, foi demonstrado que o ventrículo direito de ratos submetidos ao treinamento aeróbico de intensidade moderada em esteira rolante exibiram maior expressão da proteína SERCA2a, sem alterações na expressão do RyR2 e FLB (34).

6.5. Histomorfometria do ventrículo direito

a) Dimensões dos miócitos

A morfologia dos cardiomiócitos é um importante indicador de hipertrofia cardíaca (74). No presente estudo, observou-se que a HAP induziu aumento da largura e redução da razão comprimento/largura dos miócitos do VD. O volume de miócitos isolados do ventrículo direito de ratos tratados com monocrotalina também

aumentou. O aumento do volume ocorreu, possivelmente, pelo aumento da largura, o que reflete o aumento na área da secção transversal das células. Estes dados indicam uma hipertrofia do tipo concêntrica no VD, característica da HAP. Adicionalmente, houve um aumento da porcentagem de núcleo, o que pode estar relacionado ao aumento de outros tipos celulares não-miócitos (como: fibroblastos, células endoteliais, mastócitos e células musculares lisas vasculares). Estes achados são compatíveis com hipertrofia cardíaca patológica e estão em concordância com o aumento da massa do VD e das razões (VD/massa corporal, VD/coração, VD/VE+septo), observadas nos animais do grupo HAP. Este tipo de remodelamento do VD é característico desse modelo de HAP e está associado à regulação negativa da cascata fosfoinositide - 3 - quinase (PI3K) / proteína quinase B (Akt) / via de mamíferos alvo da rapamicina (mTOR), ao aumento de colágeno e da resistência da artéria pulmonar, conforme demonstrado neste estudo e por estudos anteriores (13, 34, 90, 93).

Em relação aos efeitos do treinamento aeróbico, os resultados mostram que o programa de exercício aplicado reduziu a área de secção transversa e o volume dos miócitos isolados do VD. Isso ocorreu, provavelmente, em resposta à redução da resistência da artéria pulmonar que, por sua vez reduz a sobrecarga ao VD. De fato, tem sido demonstrado que o treinamento aeróbico pode atenuar o remodelamento adverso do VD neste modelo de HAP (34). Adicionalmente, Pacagnelli et al.(62) demonstram que três semanas de treinamento aeróbico reduziu a área de secção transversa atenuando, assim, o remodelamento adverso do VD.

b) Estruturas celulares e extracelulares

O ventrículo direito dos animais que foram injetados com monocrotalina apresentou porcentagem de citoplasma dos miócitos reduzida e porcentagens de núcleo e colágeno aumentadas. Essas são alterações indicativas de remodelamento e fibrose, cujo acúmulo de fibrose tem um impacto negativo na função cardíaca, afetando a rigidez cardíaca, promovendo arritmias e prejudicando a difusão de oxigênio para os cardiomiócitos (27). Em contraste, o programa de exercício aeróbico aplicado aumentou a porcentagem do citoplasma de miócitos e reduziu a porcentagem de núcleo e de colágeno. Esses achados corroboram com os do estudo de Moreira-

Gonçalves et al. (34). Eles sugerem que uns dos fatores que podem explicar a melhora da função cardíaca nos animais treinados com exercício aeróbico contínuo é o efeito anti-inflamatório do exercício (ex.: induz menor expressão de TNF α /IL10). Da mesma forma, o exercício aeróbico exerce efeito anti-fibrótico, além de regular os níveis de mRNA da ET-1 e VEGF no VD e, conseqüentemente, há redução da disposição de colágeno e de apoptose no VD. Há relatos também que o treinamento aeróbico atenua o remodelamento cardíaco patológico, pois pode modular subgrupos de linfócitos T circulantes e melhor o perfil alterado de citocinas circulantes na HAP (94, 95).

6.6. Histomorfometria do pulmão direito

O pulmão direito dos animais injetados com monocrotalina (grupo MS) apresentaram espessamento e aumento das paredes alveolares e remodelação dos vasos pulmonares, em conjunto com aumento de colágeno. Além disso, foi observado um aumento proeminente de rompimento de vasos sanguíneos com hemácias dispersas ao longo do tecido, assim como fibrocolágeno ao redor dos alvéolos e excesso de infiltrado inflamatório. Essas alterações são consistentes com as reportadas em estudos anteriores (75, 96, 97). De acordo com Wu et al.(37) essas alterações na estrutura pulmonar desencadeiam o remodelamento vascular, devido à proliferação de células musculares lisas na artéria pulmonar, micro-trombose, aumento de infiltrado inflamatório, aumento da disposição de colágeno, estresse no retículo endoplasmático, aumento da expressão de BCL-2, associado à proliferação excessiva de células endoteliais.

Nogueira-Ferreira et al. (44) atribuíram essas alterações à diminuição do receptor TGF- β , diminuição da proteína BMPRII, aumento de citocinas inflamatórias e vasoconstrição pulmonar sustentada. Adicionalmente, Cool et al.(80) relataram que essas anormalidades estruturais estão associadas à lesão plexiforme, caracterizada por proliferação de células endoteliais, que podem ser misturadas com células musculares lisas da artéria pulmonar, levando à ruptura e obliteração de lúmens vasculares, aumento dos níveis de ET-1, aumento da pressão arterial pulmonar e, conseqüentemente, disfunção do VD, progredindo para HAP grave. A lesão plexiforme é frequentemente precedida pelo aumento de colágeno, conforme evidenciado no presente estudo. Ainda, os mesmos autores (80), sugerem que essas alterações

desencadeiam o aumento do fluxo sanguíneo da circulação pulmonar, gerando um estresse mecânico que pode levar a alterações na expressão de genes específicos nas células endoteliais que revestem os vasos, ocasionando o aumento da resistência vascular pulmonar.

Quanto ao treinamento aeróbico contínuo aplicado, este preveniu o espaçamento do lúmen alveolar, tornando as paredes dos alvéolos mais finas e delicadas. Possivelmente, isto previne progressão da remodelação vascular e consequentemente o desenvolvimento da HAP estabelecida, uma vez que o grupo MT apresentou valores destes parâmetros similares aos dos animais controles. Sabe-se que o treinamento aeróbico estimula a produção de óxido nítrico, um fator de relaxamento vascular que também desempenha um papel importante no reparo e regeneração vascular (11). Assim, como consequência a alta pressão arterial pulmonar na HAP pode ser aliviada (96).

A manutenção do lúmen vascular está relacionada à diminuição da resistência ao fluxo sanguíneo. De fato, no presente estudo os resultados da ecocardiografia mostraram que a resistência da artéria pulmonar foi atenuada pelo treinamento aeróbico aplicado. O estudo de Colombo et al.(13) mostrou que o exercício aeróbico promove um aumento da sinalização de H_2O_2 / VEGF / p-Akt para a angiogênese fisiológica pulmonar em animais com HAP melhorando, assim, a função do VD. Deve-se notar que as alterações provocadas no tecido pulmonar desencadeiam mecanismos compensatórios no coração, essencialmente no VD, ao reduzir a sobrecarga pressórica neste.

7. CONCLUSÕES

O treinamento aeróbico contínuo de intensidade moderada previne o aumento da resistência da artéria pulmonar, previne o remodelamento adverso dos ventrículo e pulmão direitos, além de promover benefícios à contração e ao cálcio intracelular transiente em miócitos isolados do ventrículo direito durante a progressão da HAP induzida por monocrotalina em ratos. Juntos, estes efeitos resultam em maior tolerância ao esforço físico.

8. REFERÊNCIAS

1. Galiè N HM, Vachiery JL , Gibbs S , Lang I , Torbicki A , Simonneau G , Pavão A , Vonk Noordegraaf A , M Beghetti , Ghofrani A , Ma Gomez Sanchez , Hansmann G , C Klepetko , Lancellotti P , Matucci M , McDonagh T , Pierard LA , Trindade PT , Zompatori M , Hoeper M 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):67-119.
2. Farber HW, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 2004;351(16):1655-65.
3. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2019;53(1).
4. Simonneau G GN, Rubin LJ, Langleben D, Seeger W, Domenighetti G, Gibbs S, Lebec D, Speich R, Beghetti M, Rich S, Fishman A. Clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology.* 2004;43(12):5s-12s.
5. McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, Barst RJ, Farber HW, Lindner JR, et al. ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association: developed in collaboration with the American College of Chest Physicians, American Thoracic Society, Inc., and the Pulmonary Hypertension Association. *Circulation.* 2009;119(16):2250-94.
6. Simonneau G MD, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2019.
7. Ozemek C, Berry MJ, Arena R. A Review of Exercise Interventions in Pulmonary Arterial Hypertension and Recommendations for Rehabilitation Programing. *J Cardiopulm Rehabil Prev.* 2019;39(3):138-45.
8. Lopes AC. *Tratado de Clínica Médica.* Roca. 2009;1:312-1799.
9. Wilkins MR, Aman J, Harbaum L, Ulrich A, Wharton J, Rhodes CJ. Recent advances in pulmonary arterial hypertension. *F1000Res.* 2018;7.
10. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(12 Suppl S):13S-24S.

11. Crosswhite P, Sun Z. Molecular mechanisms of pulmonary arterial remodeling. *Mol Med*. 2014;20:191-201.
12. Massague´ JC, YG. Controlling TGF- β signaling. *GENES & DEVELOPMENT*. 2000;14(6):627-44.
13. Colombo R, Siqueira R, Conzatti A, de Lima Seolin BG, Fernandes TR, Godoy AE, et al. Exercise training contributes to H₂O₂/VEGF signaling in the lung of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Vascul Pharmacol*. 2016;87:49-59.
14. Izikki M, Guignabert C, Fadel E, Humbert M, Tu L, Zadigue P, et al. Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *J Clin Invest*. 2009;119(3):512-23.
15. Sun M, Ramchandran R, Chen J, Yang Q, Raj JU. Smooth Muscle Insulin-Like Growth Factor-1 Mediates Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension in Neonatal Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;55(6):779-91.
16. Lee H, Yeom A, Kim KC, Hong YM. Effect of Ambrisentan Therapy on the Expression of Endothelin Receptor, Endothelial Nitric Oxide Synthase and NADPH Oxidase 4 in Monocrotaline-induced Pulmonary Arterial Hypertension Rat Model. *Korean Circ J*. 2019.
17. Berghausen EM, Feik L, Zierden M, Vantler M, Rosenkranz S. Key inflammatory pathways underlying vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Herz*. 2019;44(2):130-7.
18. Wang JR, Zhou Y, Sang K, Li MX. [Association between pulmonary vascular remodeling and expression of hypoxia-inducible factor-1 α , endothelin-1 and inducible nitric oxide synthase in pulmonary vessels in neonatal rats with hypoxic pulmonary hypertension]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2013;15(2):138-44.
19. Vonk Noordegraaf A, Westerhof BE, Westerhof N. The Relationship Between the Right Ventricle and its Load in Pulmonary Hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(2):236-43.
20. Chin KM, Kim NH, Rubin LJ. The right ventricle in pulmonary hypertension. *Coron Artery Dis*. 2005;16(1):13-8.
21. Chin KM, Rubin LJ. Pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(16):1527-38.
22. Haddad F, Doyle R, Murphy DJ, Hunt SA. Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. *Circulation*. 2008;117(13):1717-31.
23. Lai YC, Potoka KC, Champion HC, Mora AL, Gladwin MT. Pulmonary arterial hypertension: the clinical syndrome. *Circ Res*. 2014;115(1):115-30.

24. Bogaard HJ, Abe K, Vonk Noordegraaf A, Voelkel NF. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest*. 2009;135(3):794-804.
25. Dalla Vecchia LA, Bussotti M. Exercise training in pulmonary arterial hypertension. *J Thorac Dis*. 2018;10(1):508-21.
26. Huang WC, Hsu CH, Sung SH, Ho WJ, Chu CY, Chang CP, et al. 2018 TSOC guideline focused update on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. *J Formos Med Assoc*. 2019.
27. Nogueira-Ferreira R, Moreira-Goncalves D, Silva AF, Duarte JA, Leite-Moreira A, Ferreira R, et al. Exercise preconditioning prevents MCT-induced right ventricle remodeling through the regulation of TNF superfamily cytokines. *Int J Cardiol*. 2016;203:858-66.
28. Moreira-Gonçalves D FR, Fonseca H, Padrão AI, Moreno N, Silva AF, Vasques-Nóvoa F, Gonçalves N, Vieira S, Santos M, Amado F, Duarte JA, Leite-Moreira AF, Henriques-Coelho T. . Cardioprotective effects of early and late aerobic exercise training in experimental pulmonary arterial hypertension. *Basic Res Cardiol* 2015a.
29. Ryan JJ AS. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circ Res*. 2014.
30. Fowler ED BD, Drinkhill MJ, Stones S, Helmes M, Wüst RCI, Stienen GJM, Steele DS, White E. . Decreased creatine kinase is linked to diastolic dysfunction in rats with right heart failure induced by pulmonary artery hypertension. . *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015.
31. Kusakari Y, Urashima T, Shimura D, Amemiya E, Miyasaka G, Yokota S, et al. Impairment of Excitation-Contraction Coupling in Right Ventricular Hypertrophied Muscle with Fibrosis Induced by Pulmonary Artery Banding. *PLoS One*. 2017;12(1):e0169564.
32. E.D. Fowler DB, M.J. Drinkhill, R. Stones, M. Helmes, R.C. Wust, et al.,. Decreased creatine kinase is linked to diastolic dysfunction in rats with right heartfailure induced by pulmonary artery hypertension. , *J Mol Cell Cardiol* 2018.
33. Pacagnelli FL SA, Okoshi K, Mariano TB, Campos DHS, Carvalho RF, Cicogna AC, Vanderlei LCM. Preventive aerobic training exerts a cardioprotective effect on rats treated with monocrotaline. *Int J Exp Pathol*. 2016.
34. Moreira-Goncalves D, Ferreira R, Fonseca H, Padrao AI, Moreno N, Silva AF, et al. Cardioprotective effects of early and late aerobic exercise training in experimental pulmonary arterial hypertension. *Basic Res Cardiol*. 2015;110(6):57.
35. Ryan JJ HJ, Kutty S, Hatton ND, Bowman L, Tian L, Herr JE, Johri AM, Archer SL. Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension. *Can J Cardiol*. 2015.

36. Yanna Du JF, Li Yao, Dan Zhang, Na Liu, and Xindong Xue. Effects of FHL1 and P21 on hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling in neonatal rats. *Exp Ther Med*. 2017.
37. Wu Y, Adi D, Long M, Wang J, Liu F, Gai MT, et al. 4-Phenylbutyric Acid Induces Protection against Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157538.
38. Babu AS, Morris NR, Arena R, Myers J. Exercise-based evaluations and interventions for pulmonary hypertension with connective tissue disorders. *Expert Rev Respir Med*. 2018;12(7):615-22.
39. Gaine SP, Rubin LJ. Medical and surgical treatment options for pulmonary hypertension. *Am J Med Sci*. 1998;315(3):179-84.
40. Provencher S, Herve P, Sitbon O, Humbert M, Simonneau G, Chemla D. Changes in exercise haemodynamics during treatment in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2008;32(2):393-8.
41. Panagiotou M, Peacock AJ, Johnson MK. Respiratory and limb muscle dysfunction in pulmonary arterial hypertension: a role for exercise training? *Pulm Circ*. 2015;5(3):424-34.
42. Dutta S SP. Men and mice: Relating their ages. *Life Sciences*. 2016;152:244-8.
43. Souza-Rabbo MP, Silva LF, Auzani JA, Picoral M, Khaper N, Bello-Klein A. Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008;35(8):944-8.
44. Nogueira-Ferreira R, Vitorino R, Ferreira R, Henriques-Coelho T. Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. *Pulm Pharmacol Ther*. 2015;35:8-16.
45. Doggrell SA, Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res*. 1998;39(1):89-105.
46. Werchan PM, Summer WR, Gerdes AM, McDonough KH. Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol*. 1989;256(5 Pt 2):H1328-36.
47. Chia KS, Wong PK, Faux SG, McLachlan CS, Kotlyar E. The benefit of exercise training in pulmonary hypertension: a clinical review. *Intern Med J*. 2017;47(4):361-9.
48. Pescatello LS, Franklin BA, Fagard R, Farquhar WB, Kelley GA, Ray CA, et al. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. *Med Sci Sports Exerc*. 2004;36(3):533-53.
49. Harzheim D, Klose H, Pinado FP, Ehlken N, Nagel C, Fischer C, et al. Anxiety and depression disorders in patients with pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Respir Res*. 2013;14:104.

50. Somaini G, Hasler ED, Saxer S, Huber LC, Lichtblau M, Speich R, et al. Prevalence of Anxiety and Depression in Pulmonary Hypertension and Changes during Therapy. *Respiration*. 2016;91(5):359-66.
51. Troosters T, Casaburi R, Gosselink R, Decramer M. Pulmonary rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(1):19-38.
52. Piepoli MF, Davos C, Francis DP, Coats AJ, ExTra MC. Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH). *BMJ*. 2004;328(7433):189.
53. Mereles D, Ehlken N, Kreuzer S, Ghofrani S, Hoeper MM, Halank M, et al. Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Circulation*. 2006;114(14):1482-9.
54. Grunig E, Maier F, Ehlken N, Fischer C, Lichtblau M, Blank N, et al. Exercise training in pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue diseases. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(3):R148.
55. Weinstein AA, Chin LM, Keyser RE, Kennedy M, Nathan SD, Woolstenhulme JG, et al. Effect of aerobic exercise training on fatigue and physical activity in patients with pulmonary arterial hypertension. *Respir Med*. 2013;107(5):778-84.
56. Babu AS, Padmakumar R, Maiya AG, Mohapatra AK, Kamath RL. Effects of Exercise Training on Exercise Capacity in Pulmonary Arterial Hypertension: A Systematic Review of Clinical Trials. *Heart Lung Circ*. 2016;25(4):333-41.
57. Arena R, Cahalin LP, Borghi-Silva A, Myers J. The effect of exercise training on the pulmonary arterial system in patients with pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis*. 2015;57(5):480-8.
58. Handoko ML, de Man FS, Happe CM, Schaliij I, Musters RJ, Westerhof N, et al. Opposite effects of training in rats with stable and progressive pulmonary hypertension. *Circulation*. 2009;120(1):42-9.
59. Natali AJ, Fowler ED, Calaghan SC, White E. Voluntary exercise delays heart failure onset in rats with pulmonary artery hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;309(3):H421-4.
60. Zimmer A, Teixeira RB, Bonetto JH, Siqueira R, Carraro CC, Donatti LM, et al. Effects of aerobic exercise training on metabolism of nitric oxide and endothelin-1 in lung parenchyma of rats with pulmonary arterial hypertension. *Mol Cell Biochem*. 2017;429(1-2):73-89.
61. Becker-Grunig T, Klose H, Ehlken N, Lichtblau M, Nagel C, Fischer C, et al. Efficacy of exercise training in pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease. *Int J Cardiol*. 2013;168(1):375-81.

62. Pacagnelli FL, de Almeida Sabela AK, Okoshi K, Mariano TB, Campos DH, Carvalho RF, et al. Preventive aerobic training exerts a cardioprotective effect on rats treated with monocrotaline. *Int J Exp Pathol*. 2016;97(3):238-47.
63. Natali LLSRDMTRJLDCFLRFMNNP-GAC-JCCRJ. Voluntary running counteracts right ventricular adverse remodeling and myocyte contraction impairment in pulmonary arterial hypertension model. *Life Sciences*. 2019.
64. Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2007;6:38.
65. Trueblood NA, Inscore PR, Brenner D, Lugassy D, Apstein CS, Sawyer DB, et al. Biphasic temporal pattern in exercise capacity after myocardial infarction in the rat: relationship to left ventricular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(1):H244-9.
66. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. 1978;58(6):1072-83.
67. CONCEA. Diretrizes da prática de Eutanásia. 2013:p. 25-6.
68. Natali AJ, Wilson LA, Peckham M, Turner DL, Harrison SM, White E. Different regional effects of voluntary exercise on the mechanical and electrical properties of rat ventricular myocytes. *J Physiol*. 2002;541(Pt 3):863-75.
69. Kondo RP, Dederko DA, Teutsch C, Chrast J, Catalucci D, Chien KR, et al. Comparison of contraction and calcium handling between right and left ventricular myocytes from adult mouse heart: a role for repolarization waveform. *J Physiol*. 2006;571(Pt 1):131-46.
70. RODRIGUES JA. EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBICO SOBRE A CONTRATILIDADE DE CARDIOMIÓCITOS E A EXPRESSÃO DE MICRORNAS 214 e 208 NO VENTRÍCULO ESQUERDO DE RATOS SHR. Universidade Federal de Viçosa. 2016:1-71.
71. Bozi LH, Maldonado IR, Baldo MP, Silva MF, Moreira JB, Novaes RD, et al. Exercise training prior to myocardial infarction attenuates cardiac deterioration and cardiomyocyte dysfunction in rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68(4):549-56.
72. Novaes JB, Jr., Talma E, Las Casas EB, Aregawi W, Kolstad LW, Mantell S, et al. Can pulpal floor debonding be detected from occlusal surface displacement in composite restorations? *Dent Mater*. 2018;34(1):161-9.
73. Novaes RD, Penitente AR, Goncalves RV, Talvani A, Neves CA, Maldonado IR, et al. Effects of *Trypanosoma cruzi* infection on myocardial morphology, single

cardiomyocyte contractile function and exercise tolerance in rats. *Int J Exp Pathol*. 2011;92(5):299-307.

74. Wang Z, Patel JR, Schreier DA, Hacker TA, Moss RL, Chesler NC. Organ-level right ventricular dysfunction with preserved Frank-Starling mechanism in a mouse model of pulmonary arterial hypertension. *J Appl Physiol* (1985). 2018;124(5):1244-53.

75. Du Y, Fu J, Yao L, Zhang D, Liu N, Xue X. Effects of FHL1 and P21 on hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling in neonatal rats. *Exp Ther Med*. 2017;14(5):4245-53.

76. Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn*. 1978;41(3):267-74.

77. Pan LC, Lame MW, Morin D, Wilson DW, Segall HJ. Red blood cells augment transport of reactive metabolites of monocrotaline from liver to lung in isolated and tandem liver and lung preparations. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1991;110(2):336-46.

78. Ahmed LA; Obaid AZ, HF; Agha, AM. 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;740:379–87.

79. Ryan JJ, Archer SL. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circ Res*. 2014;115(1):176-88.

80. Cool CD, Deutsch G. Pulmonary arterial hypertension from a pediatric perspective. *Pediatr Dev Pathol*. 2008;11(3):169-77.

81. Wang L, Wang Y, Lei Z. Chrysin ameliorates ANTU-induced pulmonary edema and pulmonary arterial hypertension via modulation of VEGF and eNOs. *J Biochem Mol Toxicol*. 2019;33(7):e22332.

82. Ehlken N, Lichtblau M, Klose H, Weidenhammer J, Fischer C, Nechwatal R, et al. Exercise training improves peak oxygen consumption and haemodynamics in patients with severe pulmonary arterial hypertension and inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a prospective, randomized, controlled trial. *Eur Heart J*. 2016;37(1):35-44.

83. Kashimura O, Sakai A, Yanagidaira Y. Effects of exercise-training on hypoxia and angiotensin II-induced pulmonary vasoconstrictions. *Acta Physiol Scand*. 1995;155(3):291-5.

84. Favret F, Henderson KK, Allen J, Richalet JP, Gonzalez NC. 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):20-5.

85. Brown MB, Neves E, Long G, Graber J, Gladish B, Wiseman A, et al. High-intensity interval training, but not continuous training, reverses right ventricular hypertrophy and dysfunction in a rat model of pulmonary hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2017;312(2):R197-R210.
86. Schober KE, Baade H. Doppler echocardiographic prediction of pulmonary hypertension in West Highland white terriers with chronic pulmonary disease. *J Vet Intern Med*. 2006;20(4):912-20.
87. Tossavainen E, Soderberg S, Gronlund C, Gonzalez M, Henein MY, Lindqvist P. Pulmonary artery acceleration time in identifying pulmonary hypertension patients with raised pulmonary vascular resistance. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2013;14(9):890-7.
88. Majerczak J, Grandys M, Duda K, Zakrzewska A, Balcerczyk A, Kolodziejcki L, et al. Moderate-intensity endurance training improves endothelial glycocalyx layer integrity in healthy young men. *Exp Physiol*. 2017;102(1):70-85.
89. Ashor AW, Lara J, Siervo M, Celis-Morales C, Oggioni C, Jakovljevic DG, et al. Exercise modalities and endothelial function: a systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *Sports Med*. 2015;45(2):279-96.
90. Kemi OJ, Wisloff U. Mechanisms of exercise-induced improvements in the contractile apparatus of the mammalian myocardium. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010;199(4):425-39.
91. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198-205.
92. Maier LS, Bers DM. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34(8):919-39.
93. Shults NV, Kanovka SS, Ten Eyck JE, Rybka V, Suzuki YJ. Ultrastructural Changes of the Right Ventricular Myocytes in Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Heart Assoc*. 2019;8(5):e011227.
94. Harbaum L, Renk E, Yousef S, Glatzel A, Luneburg N, Hennigs JK, et al. Acute effects of exercise on the inflammatory state in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *BMC Pulm Med*. 2016;16(1):145.
95. Taylor S, Dirir O, Zamanian RT, Rabinovitch M, Thompson AAR. The Role of Neutrophils and Neutrophil Elastase in Pulmonary Arterial Hypertension. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:217.
96. Kadyk LC, DeWitt ND, Gomperts B. Proceedings: Regenerative Medicine for Lung Diseases: A CIRM Workshop Report. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(10):1823-8.
97. Dishop MK. Diagnostic Pathology of Diffuse Lung Disease in Children. *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol*. 2010;23(1):69-85.