

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO

MARÍLIA SOUSA FERREIRA

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO COMBINADO SOBRE O
REMODELAMENTO VASCULAR PULMONAR EM MODELO EXPERIMENTAL
DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR**

SÃO PAULO

2023

MARÍLIA SOUSA FERREIRA

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO COMBINADO SOBRE O
REMODELAMENTO VASCULAR PULMONAR EM MODELO EXPERIMENTAL
DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR**

Dissertação apresentada à Universidade Nove de
Julho para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Reabilitação.

Orientador: Profa. Dra. Kátia De Angelis

Co-orientadora: Profa. Dra. Marcelle Ribeiro

SÃO PAULO

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira, Marília Sousa.

Efeito do treinamento físico combinado sobre o remodelamento vascular pulmonar em modelo experimental de hipertensão arterial pulmonar. / Marília Sousa Ferreira. 2023.

50 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2023.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Kátia De Angelis.

1. Hipertensão pulmonar. 2. Treinamento físico.
3. Artéria pulmonar. 4. Colágeno. 5. Ratos.

I. Angelis, Kátia De. II. Título

CDU 615.8

São Paulo, 13 de dezembro de 2023.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): MARÍLIA SOUSA FERREIRA

Título da Dissertação: "EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO COMBINADO SOBRE O REMODELAMENTO VASCULAR PULMONAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR"

Presidente: PROFA. DRA. KÁTIA DE ANGELIS LOBO DAVILA

 Digite o texto aqui

Membro: PROFA. DRA. LUCIANA MARIA MALOSÁ SAMPAIO JORGE



Documento assinado digitalmente
gov.br DANIELLE DA SILVA DIAS
Data: 13/12/2023 17:32:50-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Membro: PROFA. DRA.: DANIELLE DA SILVA DIAS

DEDICATÓRIA

Ao mestre de todos os tempos meu Jesus, aos meus filhos Alice e Gabriel que são minhas grandes paixões, ao meu amado esposo Leidinaldo pela fiel caminhada ao meu lado. Aos meus queridos pais Alcides e Marily pelo apoio permanente mesmo estando tão distantes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente Deus por ser minha fortaleza e socorro bem presente, está comigo em toda trajetória, ter me permitido vivenciar e alcançar essa conquista.

Aos meus filhos Alice e Gabriel por serem meu combustível diário para eu não desistir, e ao meu esposo Leidinaldo por ser meu maior incentivador. Aos meus pais Alcides e Marily e irmãos Moisés, Romário e Mayara por toda oração e amor incondicional; à minha vizinha Helena e meu vizinho José Elias por todo carinho, palavras de ânimo e encorajamento.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Kátia De Angelis por toda disponibilidade, compreensão, empatia, por ser tão humana, um verdadeiro anjo ao longo dessa jornada. À minha co-orientadora Profa. Dra. Marcelle Ribeiro pelos ensinamentos, por sempre responder os e-mails e mensagens e por contribuir na minha formação.

Ao Prof. Dr. professor Dirceu Costa por quem tenho um carinho imenso.

Ao profissionais e colegas do Laboratórios de Fisiologia Translacional da UNINOVE, do Laboratório de Fisiologia do Exercício da UNIFESP e do Laboratório de Biologia Celular da USP, em especial a Profa. Dra. Nilsa Damaceno por todos ensinamentos e instruções. Aos colegas de iniciação científica e da pós-graduação. As Profas. Dras. professores Luciana Malosa e Danielle Dias por aceitarem o convite para participar da minha banca.

Agradeço a Universidade Nove de Julho - UNINOVE e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo financiamento, apoio e amparo à pesquisa. O meu muito, muito obrigada!

RESUMO

Introdução: A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma condição grave e progressiva, que cursa com dramático remodelamento das artérias e arteríolas pulmonares. Tais alterações resultam no aumento progressivo da resistência vascular pulmonar (RVP), levando a sobrecarga no ventrículo direito (VD), e consequentemente à morte. O treinamento físico (TF) combinado, que associa protocolos aeróbios e resistidos, é amplamente utilizado pelos serviços de reabilitação em pacientes com HAP; contudo, permanece desconhecido os seus efeitos sobre as alterações estruturais da vasculatura pulmonar na HAP. **Objetivo:** esse estudo investigou o efeito TF combinado de moderada intensidade sobre os indicadores de remodelamento vascular pulmonar em um modelo experimental de HAP induzido por monocrotalina (MCT). **Métodos:** para testar essas hipóteses, ratos Wistar (250-300g) receberam injeção subcutânea de MCT (40 µg/kg de peso corporal) ou salina. Os mesmos foram divididos em grupos submetidos à 4 semanas de TF combinado: MCT-T (aeróbio: 40-60% Vel. Máx., 3x/semana; resistido: 40-60% Carga Máx, 2x/semana) ou grupos sedentários: MCT-S e SAL-S. A espessura da túnica média arteriolar e o depósito total de colágeno perivascular foram utilizados como marcadores de remodelamento vascular pulmonar. **Resultados:** o modelo de HAP cursa com aumento da espessura da túnica média das arteríolas pulmonares e níveis similares de colágeno perivascular comparados ao grupo saudável. Por outro lado, o TF preveniu o remodelamento da túnica média e reduziu o depósito de colágeno total perivascular nos animais com HAP (MCTT) quando comparados aos grupos sedentários. Tais achados originais reforçam o efeito benéfico do TF combinado na prevenção das alterações vasculares precoces na HAP.

Palavras-chave: hipertensão pulmonar, treinamento físico, artéria pulmonar, colágeno, ratos.

ABSTRACT

Introduction: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a serious and progressive condition characterized by dramatic remodeling of pulmonary arteries and arterioles. These changes result in a progressive increase in pulmonary vascular resistance (PVR), leading to overload on the right ventricle (RV) and, consequently, to death. Combined exercise training (ET), which combines aerobic and resistance protocols, is widely used in rehabilitation services for PAH patients; however, its effects on structural changes in pulmonary vasculature in PAH remain unknown. **Objective:** This study investigated the effect of moderate-intensity combined aerobic and resistance ET on indicators of pulmonary vascular remodeling in an experimental model of PAH induced by monocrotaline (MCT). **Methods:** To test these hypotheses, Wistar rats (250-300g) received subcutaneous injection of MCT (40 µg/kg body weight) or saline. They were divided into groups subjected to 4 weeks of combined ET: MCT-T (aerobic: 40-60% Velmax, 3x/week; resistance: 40-60% Wmax, 2x/week) or sedentary groups: MCT-S and SAL-S. Arteriolar medial layer thickness and total perivascular collagen deposition were used as markers of pulmonary vascular remodeling. **Results:** The PAH model led to an increase in the thickness of the medial layer of pulmonary arterioles and similar levels of perivascular collagen compared to the healthy group. On the other hand, ET prevented medial layer remodeling and reduced total perivascular collagen deposition in animals with PAH (MCT-T) compared to sedentary groups. These original findings reinforce the beneficial effect of combined ET in preventing early vascular changes in PAH.

Keywords: pulmonary hypertension, physical training, pulmonary artery, collagen, rats.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Peso corporal pré-indução de HAP e pós-treinamento físico.....	26
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental	19
Figura 2. Pulmão direito insuflado com formaldeído.....	21
Figura 3. Demonstração da medida do diâmetro menor dos vasos pulmonares.....	22
Figura 4. Demonstração da sobreposição de pontos à imagem para análise do colágenos	23
Figura 5. Painei A: Indicador ecocardiográfico de aumento da resistência vascular pulmonar. Painei B: Imagens representativas do fluxo da artéria pulmonar.....	24
Figura 6. Indicadores de hipertrofia cardíaca nos grupos Hipertensão Arterial Pulmonar	25
Figura 7. Indicadores de tolerância ao exercício físico.....	27
Figura 8. Painei A: Indicador ecocardiográfico de aumento da resistência vascular pulmonar.....	28
Figura 9. Indicador histológico de remodelamento da túnica média vascular pulmonar.....	29
Figura 10. Indicador histológico de conteúdo total de colágeno perivascular.....	30
Figura 11. Indicador histológico de conteúdo total de colágeno perivascular.....	31
Figura 12. Indicador histológico de conteúdo total de colágeno perivascular.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: análise de variância

ET-1: endotelina-1

HAP: hipertensão arterial pulmonar

HE: hematoxilina-eosina

MCT: monocrotalina

MEC: matriz extracelular

mRNA: RNA mensageiro

PAPm: pressão média arterial pulmonar

PoAP: pressão de oclusão da artéria pulmonar

RVP: resistência vascular pulmonar

SAL: solução salina

Tac: tempo de aceleração do fluxo da artéria pulmonar

TE: tempo de ejeção do ventrículo direito

TE: teste de esforço

TF: treinamento físico

VD: ventrículo direito

VE: ventrículo esquerdo

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E BREVE REVISÃO DE LITERATURA	12
1.1 PAPEL DO REMODELAMENTO VASCULAR PARA A FISIOPATOLOGIA DA HAP	13
1.2 PAPEL DO TREINAMENTO FÍSICO NAS ALTERAÇÕES VASCULARES DA HAP	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 MÉTODOS	18
3.1 AMOSTRA E PROTOCOLO EXPERIMENTAL	18
3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	20
3.2.1 Teste de tolerância ao esforço máximo e treinamento físico	20
3.2.2 Eutanásia dos animais	20
3.2.3 Análises morfométricas	21
3.2.4 Processamento histológico e estudo da espessura arteriolar pulmonar e depósito de colágeno total da vasculatura pulmonar	21
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
4 RESULTADOS	24
4.1 EFICÁCIA DO ESTABELECIMENTO DE HAP POR MONOCROTALINA	24
4.2 EFEITO DO TF COMBINADO SOBRE PARÂMETROS DE GRAVIDADE DA DOENÇA	28
4.3 EFEITO DO TF COMBINADO SOBRE O REMODELAMENTO VASCULAR PULMONAR	29
5 DISCUSSÃO	32
5.1 REMODELAMENTO VASCULAR NO MODELO EXPERIMENTAL DE HAP	33
5.2 EFEITO DO TF COMBINADO SOBRE O REMODELAMENTO VASCULAR PULMONAR NO MODELO EXPERIMENTAL DE HAP	34
6 RELEVÂNCIA CLÍNICA	37
7. CONCLUSÃO	38
8. REFERÊNCIAS	39
APÊNDICE I	46
ANEXO I	47

1 INTRODUÇÃO E BREVE REVISÃO DE LITERATURA

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma condição grave e progressiva, de origem multifatorial, ⁽¹⁾ caracterizada pela elevação da pressão média arterial pulmonar (PAPm) a valores ≥ 20 mmHg em repouso, com pressão de oclusão da artéria pulmonar (PoAP) menor ou igual 15mmHg ⁽²⁾. A HAP cursa com proliferação e remodelamento das células musculares lisas, inflamação e fibrose mediada por um dramática remodelamento da matriz extracelular das artérias e arteríolas pulmonares ⁽³⁾. Tais alterações resultam no aumento progressivo da resistência vascular pulmonar (RVP), levando a sobrecarga no ventrículo direito (VD), e consequentemente à morte ⁽⁴⁾.

Seu diagnóstico é realizado através de uma investigação clínica criteriosa, baseadas em sinais e sintomas confirmada pelo cateterismo direito.⁽⁵⁾ Observa-se grande variação quanto aos dados epidemiológicos segundo a região investigada, contudo, estima-se a prevalência de 15 a 50 casos de HAP por milhões de habitantes nos Estados Unidos da América e Europa ⁽⁶⁾. Um estudo epidemiológico no Brasil evidenciou predominância de aproximadamente 5,8 por milhão de habitantes com idade média de 46 anos diagnosticada com HAP ⁽⁷⁾.

É importante ressaltar que apesar dos avanços no desenvolvimento de novos fármacos para seu tratamento, o prognóstico da HAP ainda é desfavorável, visto que a taxa de sobrevida prevista sem acesso ao tratamento específico é de 68% em 3 anos ⁽⁸⁾. Tal fato evidencia a contínua necessidade de investigações científicas sobre os mecanismos envolvidos na patologia e progressão da HAP, assim como potenciais estratégias terapêuticas para essa população ^(9, 10).

É sabido que alterações estruturais e funcionais da vasculatura pulmonar podem contribuir para o curso temporal da HAP e da intolerância ao exercício nessa população ⁽¹¹⁾. Especificamente, o remodelamento irreversível da vasculatura pulmonar contribui para a redução da complacência pulmonar e para o aumento sustentado da RVP e PAPm ⁽¹²⁾. Tais alterações levam a sobrecarga do VD e redução do débito cardíaco frente à desafios fisiológicos, como o exercício físico, caracterizando a intolerância aos esforços na HAP ⁽¹³⁾. Dentre as principais modificações percussoras do remodelamento vascular, encontram-se o aumento do depósito de colágeno I e III na matriz extracelular ⁽¹⁴⁾. Assim é possível considerar

que a ampliação no depósito de colágeno na vasculatura pulmonar seja um dos mecanismos precocemente envolvidos na intolerância ao exercício na HAP.

Em pacientes com HAP, o treinamento físico (TF) aeróbio associado ao resistido dinâmico (TF combinado), tem sido recomendado como ferramenta não farmacológica adjuvante no tratamento de pacientes estáveis ⁽¹⁵⁾. Ensaio clínico demonstraram a eficácia e segurança de protocolos supervisionados como parte de um programa de reabilitação, resultando em melhora na função cardiopulmonar e muscular, na capacidade do exercício e, por consequência, na sobrevida desses indivíduos ⁽¹⁶⁾. Os possíveis mecanismos responsáveis por tais melhoras incluem a redução da fibrose na vasculatura pulmonar ⁽¹⁷⁾, o restabelecimento na função diastólica do VD, redução da RVP, aumento da capilarização dos pequenos e médios vasos, reparo na capacidade oxidativa do coração e dos músculos respiratórios, além de aumento da força inspiratória ⁽¹⁰⁾.

Especificamente sobre as alterações estruturais da vasculatura pulmonar, estudos demonstraram que animais com HAP induzida por monocrotalina (MCT) ⁽¹⁸⁾, o TF aeróbio contínuo iniciado antes do desenvolvimento da HAP ⁽¹⁹⁾ atenuou o acúmulo de colágeno e normalizou a RVP ⁽²⁰⁾. Destaca-se, no entanto, que este protocolo foi realizado antes do estabelecimento da HAP ⁽²¹⁾. Assim, permanece desconhecido se tais benefícios associados ao TF seriam observados após o estabelecimento da HAP. Adicionalmente, observa-se a carência de estudos que tenham investigado os efeitos do TF combinado sobre as alterações estruturais da vasculatura pulmonar na HAP ⁽²²⁾, o que caracteriza a lacuna elencada nesse estudo.

1.1 Papel do remodelamento vascular para a fisiopatologia da HAP

Em circunstâncias habituais, a circulação pulmonar apresenta baixa pressão e resistência ao fluxo sanguíneo, as paredes vasculares são mais finas e as camadas dos músculos lisos são menos espessas, favorecendo uma distribuição do fluxo sanguíneo pelos ventrículos adequada ⁽²³⁾. No entanto, a HAP cursa com modificações estruturais na vasculatura pulmonar ⁽²⁴⁾, levando ao aumento da RVP e PAPm ⁽²⁵⁾. Com a progressão da doença e o aumento sustentado da RVP e PAPm, verifica-se a elevação da pós-carga e hipertrofia do VD e em último estágio, há

declínio do débito cardíaco e insuficiência cardíaca ⁽²⁶⁾. Tais transformações hemodinâmicas explicam os sinais e sintomas da HAP: ineficiência ventilatória, dor torácica, tosse, tonturas e a fadiga progressiva aos esforços físicos ⁽²⁷⁾. Em vista disso, destaca-se que o remodelamento vascular pulmonar é considerado a base patológica da HAP e, uma vez instalado, reforça a sua consolidação ⁽²⁸⁾.

Especificamente, no curso temporal da HAP, observa-se a lesão do endotélio vascular pulmonar, caracterizado pelo aumento do processo inflamatório, assim como o desequilíbrio entre substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras ⁽²⁹⁾. Tais alterações são acompanhadas de hiperplasia nos vasos adventícios e hipertrofia da camada média dos vasos proximais, além de fibrose da camada íntima ⁽³⁰⁾. Observa-se ainda o aumento no depósito de colágeno tipo I e III na matriz extracelular, causando o aglomerado de fibrose na camada íntima e resultando em remodelamento vascular irreversível ⁽³¹⁾. Esse remodelamento vascular pulmonar na HAP induz: (a) enrijecimento e a redução da complacência vascular pulmonar, (b) obstrução e obliteração das artérias pulmonares devido à perda de volume vascular arterial, (c) indução da vasoconstrição, (d) fluxo sanguíneo restrito através dos vasos pulmonares e (e) aumento da RVP e da PAPm. Consequentemente, o aumento da pós-carga é direcionado para a parede fina do VD, que inicialmente hipertrofia, mas, com o passar do tempo leva ao declínio da função e do débito cardíaco e ao desenvolvimento da insuficiência de câmara cardíaca direita. As alterações multicelulares intravasculares constituem ainda um importante fator de risco para essa população, visto que em um estado avançado da doença, essa cascata de eventos inflamatórios predispõe o desenvolvimento de trombose ⁽²⁶⁾.

Evidências acumuladas nos últimos anos demonstram que as alterações estruturais vasculares também contribuem para a intolerância ao exercício na HAP. Especificamente, o exercício físico requer a interação de vários mecanismos fisiológicos. Em pacientes com HAP, numerosas anomalias respiratórias, cardiovasculares e musculoesqueléticas diminuem a eficácia do transporte e utilização de O₂ para os músculos ativos ⁽³²⁾. Embora a fisiopatologia da intolerância aos esforços seja multifatorial, a disfunção ventricular é uma especificidade prevalente ⁽³³⁾. Um dos principais fatores é a sobrecarga do VD, imposta a partir do aumento progressivo e irreversível da RVP e PAPm ⁽³²⁾, que como já descrito, é consequência do remodelamento vascular pulmonar irreversível ⁽³⁴⁾.

1.2 Papel do treinamento físico nas alterações vasculares da HAP

O TF é indicado como componente adjuvante para melhora dos parâmetros clínicos, da tolerância ao exercício e qualidade de vida em pacientes com HAP ⁽³⁵⁾. Nesse sentido, a prática regular de exercícios físicos é eficiente para conter as irregularidades cardiorrespiratória que a HAP impõe constatando melhora da capacidade física, elevação da capilarização e da resistência ao esforço. O TF ajuda a restaurar o equilíbrio dos tecidos vasculares, eliminando possíveis mecanismos de danos e contribuindo positivamente para diminuição de risco de hospitalizações ^(36, 37). Especificamente, evidências demonstram que o protocolo de TF combinado (componente aeróbico associado ao resistido) de moderada intensidade melhora as repercussões sistêmicas negativas, auxiliando na redução da sobrecarga no VD.

Dentre os protocolos de TF aeróbio recomendado em diferentes *Guidelines* para Reabilitação Cardíaca e Pulmonar ^(38, 39), seguros e eficazes para HAP estável ⁽⁴⁰⁾, e demais doenças cardiorrespiratórias, destaca-se a modalidade intervalada ^(41, 42). Essa modalidade - caracterizada por curtos períodos de moderada intensidade seguidos de recuperação em baixa intensidade - permite ao paciente atingir cargas superiores com menor sobrecarga cardiocirculatória ^(43, 44) e é constantemente utilizada na prática clínica em conjunto ao resistido dinâmico nessa população ⁽⁴⁵⁾. Ainda, em modelo experimental de HAP com MCT, as vantagens obtidas pelo TF intervalado para a função e estrutura cardíaca foram superiores ao contínuo ⁽⁴⁶⁾.

A importância de reabilitar através de um protocolo adequado tem mostrado efetividade sobre HAP, como demonstrado pela redução do remodelamento vascular pulmonar ⁽⁴⁰⁾ e da progressão da doença ⁽⁴⁷⁾. Ainda, estudos desenvolvidos tanto em seres humanos quanto em modelo experimental afirmaram estabilização da doença ⁽⁴⁷⁾. Em modelos experimentais observa-se benefícios cardiovasculares, como aumento da função diastólica, e prevenção da hipertrofia cardíaca ⁽⁴⁸⁾. Dentre as vantagens observadas na estrutura e função vascular pulmonar, verifica-se a redução do processo inflamatório, estabilização do seu remodelamento, como também da hipertrofia em cada camada dos vasos (pequenos, médios e grandes), que podem ser explicadas por proteínas sinalizadoras que são ativadas pelo exercício físico inibindo assim as vias inflamatórias, tais benefícios resultam em redução da resistência vascular pulmonar total ^(49, 50). Especificamente sobre as utilidades do TF.

Sobre as alterações vasculares, estudos recentemente demonstraram que animais com HAP induzida por MCT apresentaram aumento no depósito de colágeno I e III nas arteríolas pulmonares e menor tolerância ao exercício quando comparadas a animais controle ⁽⁵¹⁾. Contudo, o TF aeróbio contínuo iniciado antes do desenvolvimento da HAP mostrou-se capaz de minimizar o acúmulo de colágeno tipo I e III, normalizar a RVP ⁽⁵²⁾. Destaca-se, no entanto, que este protocolo foi realizado antes do estabelecimento da HAP, sendo assim, permanece desconhecido se tais efeitos benéficos seriam observados após instalação da HAP. Ainda, verifica-se carência de estudos que tenham investigado os efeitos do TF combinado sobre as alterações estruturais da vasculatura pulmonar na HAP ⁽⁵³⁾. Diante do exposto, torna-se relevante analisar a repercussão do TF combinado, de moderada intensidade, sobre parâmetros de remodelamento da vasculatura pulmonar ⁽²²⁾. Desta forma, o presente estudo tem o intuito de investigar o efeito do TF combinado de moderada intensidade sobre os parâmetros de remodelamento vascular pulmonar no modelo experimental de HAP.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Identificar, no modelo experimental de HAP por MCT, o potencial efeito do TF físico combinado sobre o remodelamento vascular pulmonar na HAP.

2.2 Objetivos específicos

Investigar o efeito do TF combinado de moderada intensidade em animais com HAP induzida por MCT e em animais controles (tratados com salina) sobre, treinados e sedentários:

- O efeito do TF combinado, de moderada intensidade, sobre a espessura da camada média arteriolar pulmonar;
- O depósito total de colágeno perivascular das arteríolas pulmonares.

3 MÉTODOS

3.1 Amostra e Protocolo Experimental

Os procedimentos descritos a seguir foram autorizados pelo Comitê de Ética e Experimentação no Uso de Animais da UNIFESP (CEUA-UNIFESP; Nº 2020/5905261120). A fase in vivo deste projeto foi previamente desenvolvida como parte de um estudo de Pós-doutorado e segue detalhada na Figura 1. No presente estudo, foram avaliadas as alterações caracterizadas pelo aumento na espessura da túnica média e no depósito de colágeno nas arteríolas pulmonares no experimental de HAP e efeito do TF sob essas alterações. Destacamos que a utilização desses tecidos previamente coletados estar alinhados com a sustentabilidade dos 3 R's da experimentação animal, que visa a redução do número de animais na pesquisa, o refinamento na condução do estudo e consequentemente a redução de possível desconforto a um outro animal.

A fase in vivo do estudo consistiu em induzir a HAP por MCT e submeter os animais ao TF intervalado, de moderada intensidade. Para tal, foram utilizados ratos wistar, machos, com 2 meses de idade (~250g), provenientes do CEDEME UNIFESP. Estes animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia dessa Instituição (máx. 4 animais/caixa), com luz controlada em ciclos de 12 horas (claro-escuro) e temperatura entre 22-24°C. Água e ração comercial foram ofertadas “ad libitum”. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 3 grupos (6-8 ratos/grupos): animais submetidos à injeção de MCT, sedentários (MCT-S) ou treinados (MCT-T); Animais controles submetidos à injeção de salina, sedentários (SAL-S).

A indução da HAP foi obtida pela injeção subcutânea de 40 mg/kg de peso corporal de MCT (Sigma-Aldrich) em dose única ⁽⁴⁰⁾. Animais controle receberam a mesma dose acima de solução salina. O estabelecimento da HAP foi confirmado após 2 semanas da administração de MCT via parâmetro ecocardiográfico indicador do aumento da RVP e da pressão arterial pulmonar PAPm: a) alteração no formato da onda de fluxo da artéria pulmonar (achado de adaga); b) redução da relação entre tempo de aceleração do fluxo artéria pulmonar (TAc) e tempo de ejeção do ventrículo direito (VD; TAc/TE) ^(40, 54). Sete dias após randomização e administração da

MCT/Salina, todos os grupos experimentais foram familiarizados em esteira e escada durante 5 dias. Na 2ª semana após administração de MCT, os animais foram submetidos ao exame ecocardiográfico para confirmação do estabelecimento de HAP⁽⁴⁰⁾ e ao teste de esforço em esteira e escada para determinação dos parâmetros pré TF aeróbio (velocidade máxima) e resistido (carga máxima), respectivamente. Vinte quatro horas pós teste de esforço, o grupo MCT-T prosseguiu com protocolo de TF combinado (esteira: 3 x/semana; escada: 2 x/semana), intervalado e de moderada intensidade, com duração de 4 semanas. Os animais dos grupos sedentários foram mantidos na mesma sala e expostos aos mesmos estímulos ambientais, excluindo-se o TF. Como parte do projeto de pós-doutorado vinculado ao presente estudo, ao fim do período de TF, os animais foram submetidos a avaliações de parâmetros cardiovasculares. Ao término dos experimentos funcionais (no 6º dia após o término do TF), os animais foram eutanasiados e sangue/tecidos foram coletados (Figura 1).

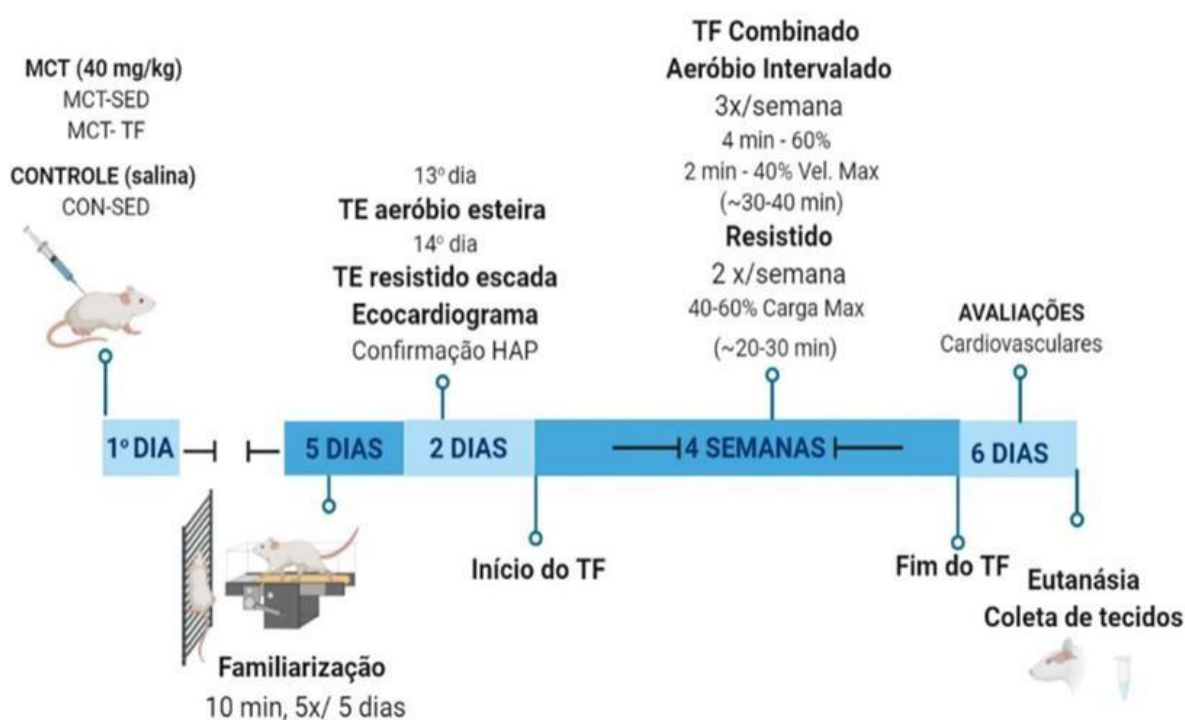


Figura 1. Sequência experimental simplificada da fase in vivo no modelo de HAP por monocrotalina (MCT) para os grupos T (treinamento físico) e S (sedentário).

3.2 Procedimentos Experimentais

3.2.1 Teste de tolerância ao esforço máximo e treinamento físico

Todos os animais foram submetidos a 5 dias de adaptação em esteira (5 minutos/sessão a 0,3 km/h), seguidos do teste progressivo para determinação do esforço aeróbio máximo. O protocolo foi composto de velocidade inicial de 0,3 km/h (0º de inclinação) e incrementos de mesma magnitude a cada 3 minutos, até a exaustão ⁽⁵⁵⁾. O teste de esforço resistido foi realizado em escada adaptada (54 degraus verticais de 0,5 cm de altura/degrau). Para determinação da carga máxima, admitiu-se que o animal deveria realizar seis escaladas, tendo a escalada inicial uma carga relativa a 75% do peso corporal. Foi adicionado 15% do peso corporal a cada subida após o descanso, até exaustão do animal ⁽⁵⁶⁾. O TF combinado foi realizado durante 4 semanas com duração e intensidade progressivas, 5 sessões/semana. As sessões foram compostas de TF aeróbio em esteira adaptada (3 sessões/semana) alternadas com o TF resistido dinâmico em escada (2 sessões/semana). O TF aeróbio seguiu um protocolo intervalado, a fim de mimetizar os benefícios observados por essa modalidade tanto em pacientes ⁽³⁵⁾ quanto em modelos experimentais de HAP ⁽⁴⁰⁾. O protocolo aeróbio alternou 4 minutos a 60% da velocidade máxima de corrida e 2 minutos a 40%, com duração de ~30-40 min ⁽⁵⁷⁾. O TF resistido seguiu a 40- 60% da carga máxima obtida no teste de esforço, com duração de ~20-30 min (15-20 escaladas com intervalo de 1 minuto) ⁽⁵⁶⁾.

3.2.2 Eutanásia dos animais

Ao término dos experimentos, os animais foram eutanasiados por decapitação após anestesia prévia e os tecidos pulmonares e cardíaco foram imediatamente retirados e pesados. O coração e o pulmão esquerdo foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados (-80°C) para preservação. O pulmão direito foi insuflado para análise histológica. Para tal, uma cânula flexível de teflon foi introduzida na traquéia para que todos os lobos direitos fossem perfundidos manualmente com formaldeído a 4% tamponado (pH 7,0) a uma pressão controlada. Em seguida, a traquéia foi clampeada para fixação do tecido pulmonar direito por um período de 24 horas. Para análise histológica, somente o lobo médio foi utilizado (Figura 2).

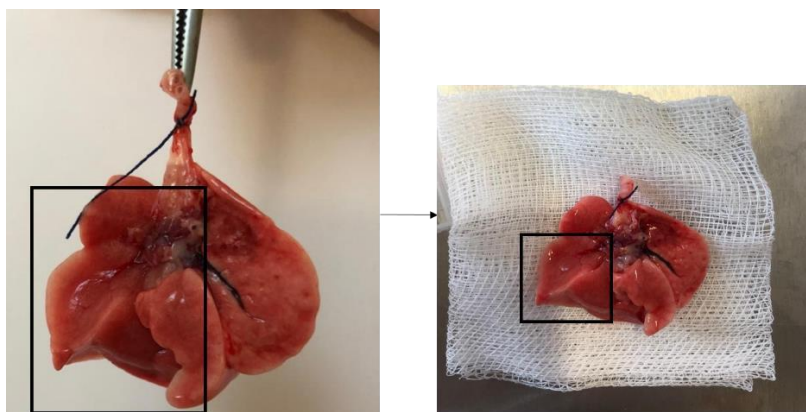


Figura 2. Pulmão direito insuflado com formaldeído 4% tamponado. Note a insuflação pulmonar direita após instilação e clampeamento da traquéia, enquanto o pulmão esquerdo é preservado. Fotografia: Paula-Ribeiro, M.

3.2.3 Análises morfológicas

Após eutanásia, o coração foi rapidamente retirado e colocado em solução KCl 1,15% sobre o gelo. Com auxílio de material cirúrgico, tesouras e pinças, os átrios foram extraídos e descartados, e o peso dos ventrículos foi usado para mensurar a hipertrofia cardíaca através da razão entre o peso do VD e o peso do VE mais o septo (índice de Fulton) ⁽⁴⁰⁾.

3.2.4 Processamento histológico e estudo da espessura arteriolar pulmonar e depósito de colágeno total da vasculatura pulmonar

Após fixação, o lobo médio foi desidratado em gradiente alcoólico (70° a 100°), diafanizado em xilol e emblocado em parafina; foram obtidos cortes de 5µm (em micrótomo Leica RM2065) para a realização deste estudo. Os preparados histológicos foram corados com *hematoxilina-eosina* (HE) e *Picrosírius red*, seguindo o protocolo padrão do Laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da USP. Posteriormente, os mesmos passaram pelo processo de hidratação e montagem das lâminas.

As lâminas coradas com *Picrosírius red* foram utilizadas para determinar a deposição total de colágeno perivascular pulmonar. Para tal, foram avaliadas as arteríolas pulmonares (25 a 100 µm) provenientes de 5 animais de cada grupo

experimental, MCT sedentários (MCT-S) ou treinados (MCT-T), animais controles sedentários (SAL-S). A aquisição das imagens ocorreu com auxílio do programa de análises de imagens digitais Image Pro-Plus (Media Cybernetics, USA) acoplado a um microscópio de luz Nikon Opitphot. Todas as imagens foram capturadas com objetiva de 20x e randomicamente selecionadas 10 fotos de vasos pulmonares. A porcentagem da área adventícia preenchida por fibras colágenas birrefringentes foi dividida pela sua área total (fibras colágenas e não colágenas). Os vasos foram, então, divididos em duas categorias de acordo com o calibre ($< 30 \mu\text{m}$, $\geq 30\mu\text{m}$), em uma tentativa de classificar conforme classes funcionais diferentes, respectivamente, arteríolas, artérias de médio e grande calibres. A partir desta classificação, foram calculadas a distribuição dos vasos em cada categoria para todos os grupos experimentais. As imagens foram transferidas para o programa de processamento de imagens chamado Image J NIH (National Institutes of Health, EUA), que permite quantificar a contagem em duas dimensões, a medida do diâmetro menor dos vasos perivascularares (Figura 3). A quantidade total por meio de pontos, a mensuração de uma cobertura de pontos sobre a foto, cada ponto correspondia a uma área de $400 \mu\text{m}$ (Figura 4).

As lâminas de HE foram utilizadas para mensurar a espessura das arteríolas pulmonares. Para essa análise, as arteríolas pulmonares com diâmetro externo $< 200 \mu\text{m}$ foram analisadas em microscópio utilizando os equipamentos e softwares acima, com aumento de 200x. Resumidamente, o remodelamento arteriolar pulmonar foi avaliado como a porcentagem da espessura da parede medial (% WT), calculada da seguinte forma: $\text{WT (\%)} = \frac{\text{diâmetro externo} - \text{diâmetro interno}}{\text{diâmetro externo}} \times 100$.

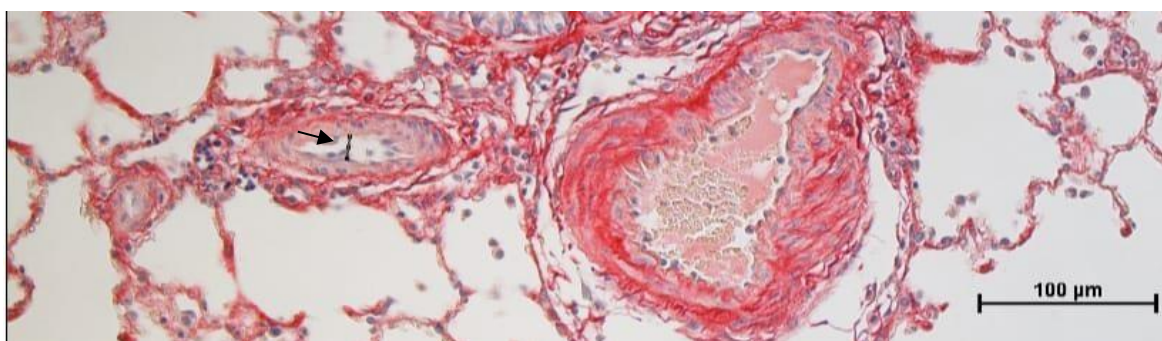


Figura 3. Demonstração da medida do diâmetro menor dos vasos pulmonares através do programa IMAGE J. A seta está indicando para a régua de demarcação do diâmetro menor do vaso.

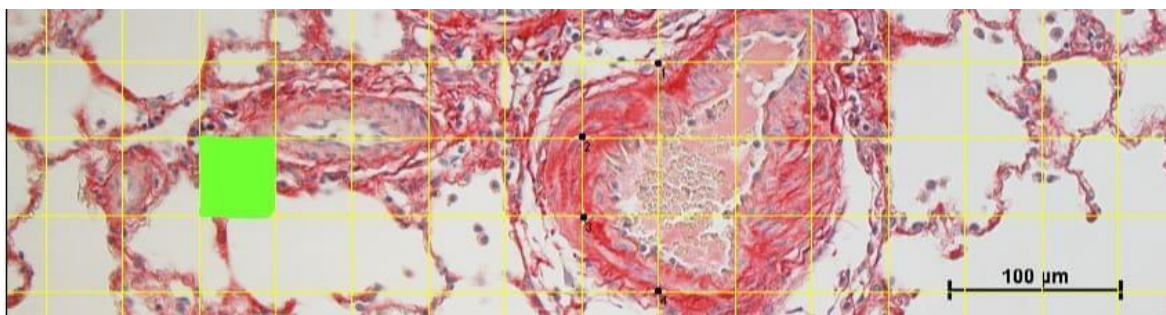


Figura 4. Demonstração da sobreposição de pontos à imagem para análise do colágenos sobre os vasos pulmonares, através do programa IMAGE J. A região demarcada em verde ilustra cada ponto.

3.3 Análise estatística

Os dados seguem apresentados em média e desvio padrão. Os pressupostos de normalidade e homogeneidade foram testados por meio dos testes Shapiro–Wilk e Levene e foram analisados via ANOVA ONE-WAY. Quando aplicável, o post-hoc de Tukey foi utilizado para múltiplas comparações. Para todos os testes, o nível de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Eficácia do estabelecimento de HAP por monocrotalina

Alterações induzidas pela MCT no leito pulmonar

O estabelecimento da HAP foi confirmado na segunda semana pós-injeção de MCT por meio redução da relação TAc/TE comparado ao grupo SAL (Figura 5. Painel A). Adicionalmente, observamos em diversos animais o entalhe na onda de fluxo da artéria pulmonar (Figura 5, Painel B), característico tanto em modelos experimentais quanto em pacientes com HAP ⁽¹⁰⁾. Em conjunto, tais achados confirmam a eficácia do estabelecimento do modelo de HAP nesse estudo.

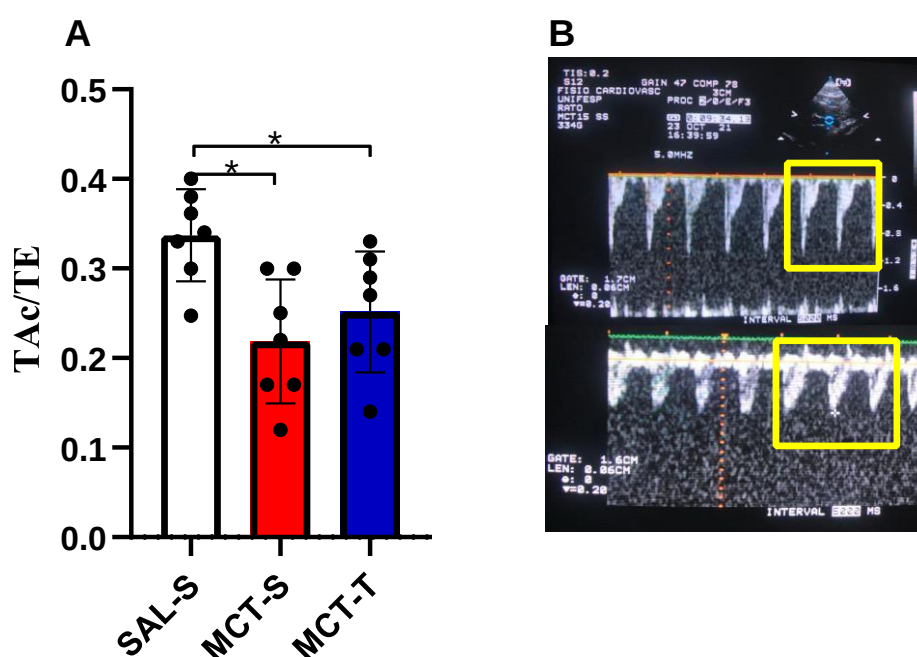


Figura 5. Painel A: Indicador ecocardiográfico de aumento da resistência vascular pulmonar medido na 2o semana após dose subcutânea de 40 mg/Kg de monocrotalina/salina nos grupos Hipertensão Arterial Pulmonar (MCT) e salina (SAL). Variáveis medidas pré início do treinamento físico. TAc/TE, razão TAc/tempo de ejeção do ventrículo direito Painel B: Imagens representativas do fluxo da artéria pulmonar no animal controle (SAL) e o formato de adaga (entalhe) no animal submetido à injeção de monocrotalina (MCT). Dados apresentados em média $\pm$ desvio padrão. ANOVA ONE-WAY * = $p \leq 0,05$ vs SAL-S.

Alterações induzidas pela MCT no tecido cardíaco

O efeito do desenvolvimento da HAP por MCT sobre a hipertrofia de VD é apresentado na Figura 6. Observamos que ambos os grupos MCT apresentaram aumento do VD (Painel A) e da razão VD/VE + S (Painel B) quando comparados ao grupo SAL-S. Contudo, o TF no grupo MCT reduziu parcialmente a diferença em relação ao SAL-S para o VD (SAL-S vs MCT-S, $p = 0,001$; SAL-S vs MCT-T, $p = 0,02$) e VD/VE + S (SAL-S vs MCT-S, $p = 0,001$; SAL-S vs MCT-T, $p = 0,03$).

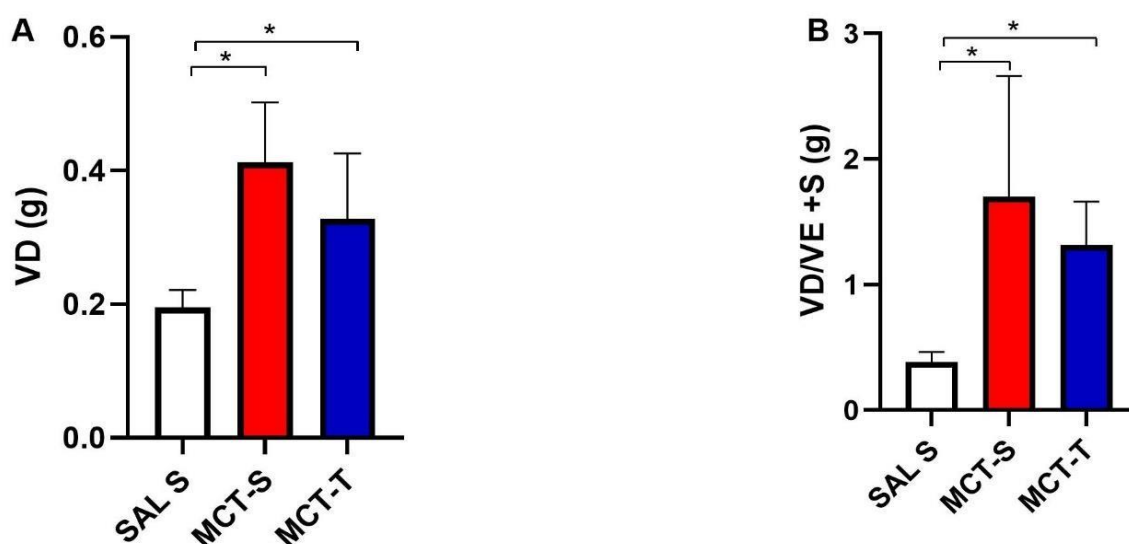


Figura 6. Indicadores de hipertrofia cardíaca nos grupos Hipertensão Arterial Pulmonar e salina, treinados (MCT-T) e sedentários (SAL-S, MCT-S). Painel A: massa do ventrículo direito (VD). Painel B: razão entre massa do ventrículo direito e massa do ventrículo esquerdo somado ao septo (VD/VE+ S). Dados apresentados em média $\pm$ desvio padrão. ANOVA ONE-WAY * = $p \leq 0,05$ vs SAL-S.

Alterações induzidas pela MCT no peso corporal

O peso corporal inicial, pré-indução da HAP, não foi diferente entre os grupos ($p > 0,05$). O peso corporal obtido após os experimentos funcionais mostrou-se reduzido no grupo MCT-S quando comparado ao SAL-S. Por outro, lado o TF preveniu essa redução visto que não houve diferença entre os grupos SAL-S e MCT-T.

Tabela 1. Peso corporal pré-indução de HAP e pós-treinamento físico.

	SAL-S	MCT-S	MCT-T	ANOVA P
Peso corporal inicial (g)	318 ± 22	319 ± 18	318 ± 20	0,99
Peso corporal final (g)	365 ± 25	330 ± 12*	355 ± 24	0,02

Grupos salina sedentário (SAL-S), monocrotalina sedentário (MCT -S) e treinado (MCT -T). Dados apresentados em média ± desvio padrão. ANOVA ONE-WAY * = $p \leq ,0.05$ vs SAL-S.

Intolerância ao exercício no modelo de HAP por monocrotalina

Os resultados equivalentes ao teste de esforço aeróbio e resistido realizados após o estabelecimento da HAP e pré-TF seguem detalhados na Figura 7. Como esperado, os grupos com HAP (MCT- S e T) apresentaram menor velocidade máxima e distância total percorrida quando comparados ao grupo Salina (painéis A e B), corroborando a intolerância ao exercício característica dessa doença. Os grupos MCT apresentaram tendência de redução quanto à carga máxima obtida no teste de esforço resistido vs SAL ($p = 0.08$).

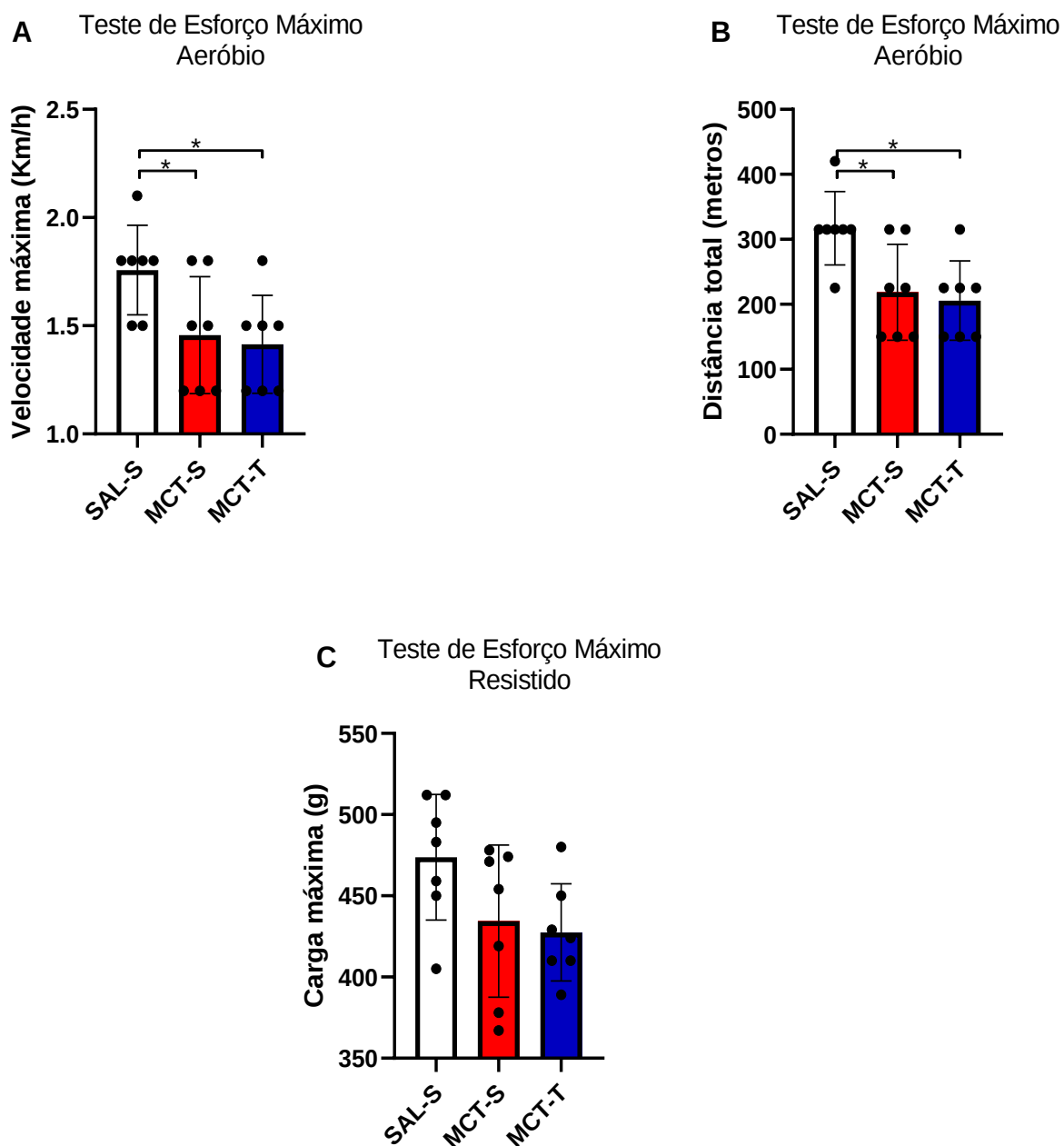


Figura 7. Indicadores de tolerância ao exercício físico obtidos via teste de esforço na 20 semana após dose subcutânea de 40 mg/Kg de monocrotalina/salina nos grupos Hipertensão Arterial Pulmonar (MCT) e salina (SAL). Variáveis medidas pré início do treinamento físico. Painéis A e B: velocidade máxima e distância máxima percorrida na esteira. Painel C: carga máxima obtida na escada. Dados apresentados em média $\pm$ desvio padrão. ANOVA ONE-WAY, * = $p \leq 0,05$ vs SAL-S.

4.2 Efeito do TF combinado sobre parâmetros de gravidade da doença

Parâmetro ecocardiográfico

A Figura 8 apresenta resultados da resistência da artéria pulmonar após o TF. O grupo MCT-S apresentou aumento da RVP via redução do TAc/TE comparado ao grupo controle (SAL-S). Por outro lado, observamos que o TF preveniu tal alteração no grupo MCT-T em relação aos seus pares sedentários (MCT-S) e normalizou a RVP em relação ao grupo SAL-S.

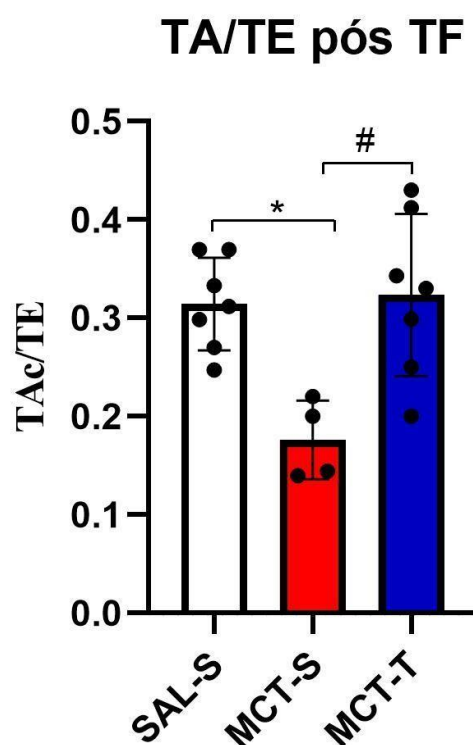


Figura 8. Painel A: Indicador ecocardiográfico de aumento da resistência vascular pulmonar medido após quatro semanas de treinamento físico. Grupos: Hipertensão Arterial Pulmonar, sedentário (MCT-S) e treinado (MCT-T) e salina sedentário (SAL-S). TAc/TE, razão Tac da artéria pulmonar/tempo de ejeção do ventrículo direito. Dados apresentados em média ± desvio padrão. ANOVA ONE-WAY * = $p \leq 0,05$ vs SAL-S; # = $p \leq .05$ vs MCT-S

4.3 Efeito do TF combinado sobre o remodelamento vascular pulmonar

Espessura da túnica média arteriolar pulmonar

A Figura 9 apresenta imagens representativas de cortes histológicos pulmão de um rato de cada grupo estudado: SAL-S, MCT-S e MCT-T, utilizadas para análise de espessura da túnica média arteriolar pulmonar. As setas nas imagens indicam o vaso analisado. Observe o aumento na espessura túnica média arteriolar no rato do MCT-S em relação aos ratos dos grupos SAL-S e MCT-T.

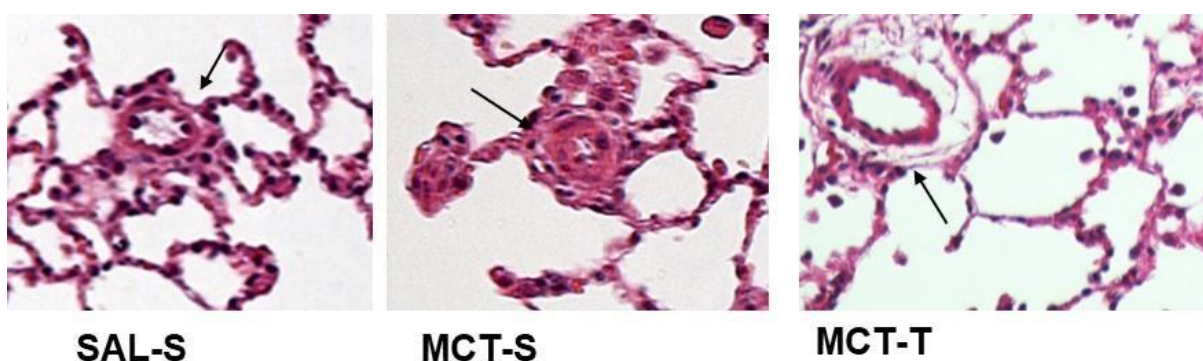


Figura 9. Imagens de cortes histológicos de pulmão utilizadas para medida análise de espessura da túnica média arteriolar pulmonar através do programa IMAGE J nos grupos SAL-S, MCT-S e MCT-T. A seta está indicando o vaso analisado.

A espessura arteriolar pulmonar medida na camada média dos vasos está apresentada na Figura 10. O grupo MCT-S apresentou aumento da espessura arteriolar pulmonar em comparação ao grupo controle (SAL-S). Por outro lado, observamos que o TF preveniu o remodelamento no grupo MCT-T em relação aos seus pares sedentários (MCT-S) e normalizou a espessura em relação ao grupo SAL-S (MCT-T vs SAL-S, $p > 0,05$).

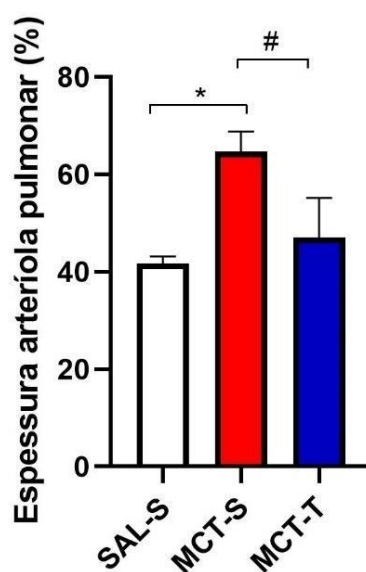


Figura 10. Indicador histológico de remodelamento da túnica média vascular pulmonar. Grupos: Hipertensão Arterial Pulmonar, sedentário (MCT-S) e treinado (MCT-T) e salina sedentário (SAL-S). Dados apresentados em média $\pm$ desvio padrão. ANOVA ONE-WAY * = $p \leq 0,05$ vs SAL-S; # = $p \leq 0,05$ vs MCT-S.

Depósito total de colágeno perivascular pulmonar

A Figura 11 apresenta imagens representativas de cortes histológicos pulmão de um rato de cada grupo estudado: SAL-S, MCT-S e MCT-T, utilizadas para o conteúdo total de colágeno perivascular pulmonar.

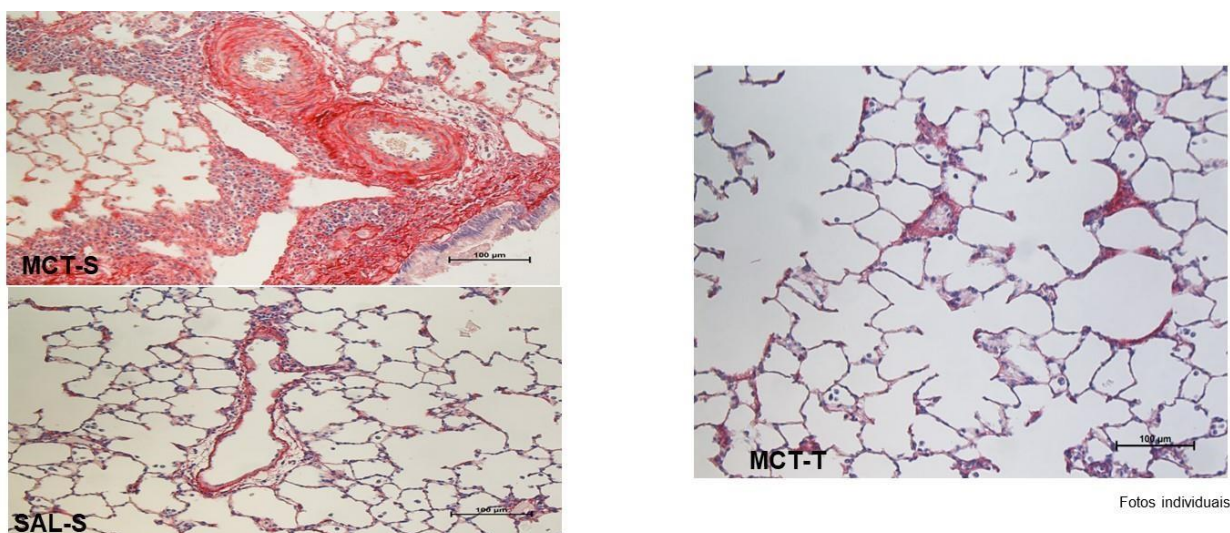


Figura 11. Imagens de cortes histológicos de pulmão utilizadas para medida análise de conteúdo total de colágeno perivascular pulmonar através do programa IMAGE J nos grupos SAL-S, MCT-S e MCT-T.

Independentemente do calibre vascular, os grupos MCT-S e SAL-S não diferiram entre si para o conteúdo total de colágeno perivascular (Figura 12, Painéis A-C). Contudo, observamos que o TF reduziu o depósito de colágeno em todos os calibres no grupo MCT-T em relação aos seus pares sedentários (MCT-S) e ao grupo SAL-S.

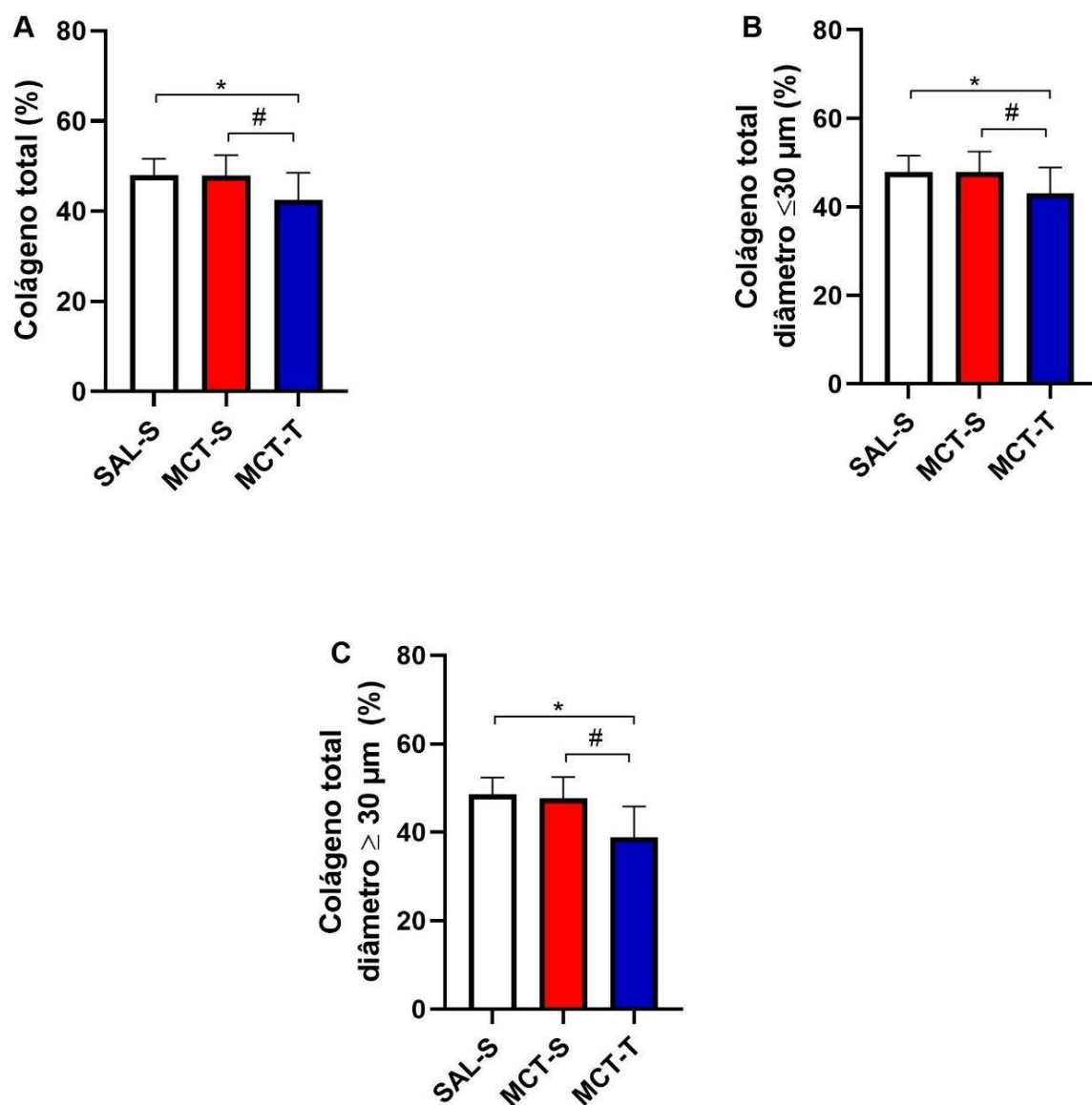


Figura 12. Indicador histológico de conteúdo total de colágeno perivascular. Grupos: Hipertensão Arterial Pulmonar, sedentário (MCT-S) e treinado (MCT-T) e salina sedentário (SAL-S). Dados apresentados em média $\pm$ desvio padrão. ANOVA ONE-WAY * = $p \leq 0,05$ vs SAL-S; # = $p \leq 0,05$ vs MCT-S.

5 DISCUSSÃO

Os objetivos deste estudo foram verificar os efeitos do treinamento físico combinado, de intensidade moderada, sobre os indicadores de remodelamento vascular pulmonar no modelo experimental de HAP. Os principais achados do estudo foram: A) o modelo de HAP cursa com aumento da espessura da túnica média das arteríolas pulmonares e níveis similares de colágeno perivascular em comparação a animais saudáveis sedentários; B) o TF aeróbio intervalado, associado ao resistido, preveniu o remodelamento da túnica média e reduziu o depósito de colágeno total perivascular nos animais com HAP (MCT-T) quando comparados aos grupos sedentários. Tais achados originais reforçam o efeito benéfico do TF na prevenção das alterações vasculares precoces na HAP.

Estabelecimento da HAP via MCT

A *Crotalaria spectabilis* é uma planta tóxica que contém a MCT como alcaloide pirrolizidínico. A MCT é metabolizada pelo fígado, desencadeando lesões cardiopulmonares, hepáticas, renais ^(58, 59). A MCT é transportada até os pulmões, iniciando um processo inflamatório persistente com liberação de vasoconstritores, ocasionando o remodelamento e hipertrofia da túnica média ⁽⁶⁰⁾. Como consequência das alterações estruturais, observa-se o aumento significativo da RVP e da pós-carga do VD e por consequência hiperplasia, levando também a elevação da PAPm. Assim, o modelo experimental de HAP induzido por MCT é frequentemente utilizado por ser uma técnica capaz de mimetizar, em semanas, os achados estruturais e funcionais observados nos pacientes com HAP. O estabelecimento da HAP via MCT é verificado através de parâmetros ecocardiográficos que comprovam o aumento da RVP e da PAPm, tal como a redução do TAc e aumento do TE, assim como as alterações no padrão de fluxo da artéria pulmonar, sendo essa similar ao estágio avançado da HAP em humanos ⁽⁶¹⁻⁶³⁾.

No presente estudo o modelo experimental de HAP por MCT foi reafirmado após 2 semanas de administração de MCT (40 mg/kg) em dose única. Geralmente esse modelo é usado com a intenção de entender melhor os mecanismos

patológicos presentes em um estado ainda estável de HAP, para ser traçados novas estratégias que venham trazer benefícios para os pacientes ^(60, 64). Os animais apresentaram aumento da RVP via redução do Tac/TE e profunda alteração no padrão do fluxo da artéria pulmonar. Esse aumento da RVP foi acompanhado de hipertrofia da túnica média, sem alteração no depósito de colágeno perivascular ⁽⁶⁵⁾. Foi possível confirmar desenvolvimento da doença também através da irregularidade cardiopulmonar característica da HAP, na qual esses animais apresentavam fadiga em concluir os exercícios propostos caracterizando intolerância aos esforços intensa ⁽⁶⁶⁾. Assim, a redução da capacidade física dos animais caracteriza e reforça o modelo de HAP por MCT. Em conjunto, os achados funcionais e estruturais do presente estudo corroboram a MCT como um modelo adequado para aprofundar com maior detalhes a fisiopatologia da HAP com o intuito de elaborar novos métodos com humanos ⁽⁶⁷⁾.

5.1 Remodelamento vascular no modelo experimental de HAP

O remodelamento vascular pulmonar tem importante efeito sobre o avanço da HAP ^(26, 28, 30). Assim, é relevante estimar e avaliar a severidade do remodelamento vascular no curso temporal da doença projetar a terapia assertiva ⁽⁶⁸⁾. Os vasos pulmonares são compostos de camada íntima, média e adventícia. A camada íntima acomoda as células endoteliais e controla a vasoconstrição, enquanto a média acomoda as lâminas elásticas permitindo resistência e distensibilidade desses vasos. Por fim, a camada adventícia é composta por colágeno e fibroblasto. O remodelamento vascular pulmonar é uma mudança na estrutura dessas camadas em resposta a estímulos mecânicos e hemodinâmicos ⁽⁶⁹⁾. No curso temporal da HAP, o aumento da fibrose abrange todas as camadas vasculares provocando enrijecimento vascular colaborando para deterioração e mudanças na MEC, uma sequência de inflamações perivasculares está acontecendo causando uma desordem na fisiopatologia normal dos vasos pulmonares desencadeando na transfiguração dos vasos ⁽⁷⁰⁾. Na camada média, o processo de remodelamento envolve crescimento, proliferação, migração e apoptose celular, além de produção e redistribuição de MEC. Soma-se a esse processo, a superprodução de colágeno (tipo I e IV) e elastina pela musculatura lisa ⁽⁷¹⁾. Na camada perivascular, o quadro de inflamação e estresse oxidativo

precedem o aumento de fibras colágenas tipo V, que também contribuem para a progressão da HAP. No curso temporal da doença, tais alterações resultarão em vasoconstrição crônica e progressiva, levando ao aumento da RVP e PAPm. Com avanço da doença e sobrecarga contínua do VD, essa câmara cardíaca sofre hipertrofia ^(24, 26, 30).

Os achados demonstrados no presente estudo corroboram os marcos fisiopatológicos descritos acima. Nesse sentido, demonstramos que mesmo em um quadro estável de HAP experimental, observamos o remodelamento da túnica média arteriolar pulmonar via aumento de sua espessura. Essa alteração foi acompanhada de hipertrofia do VD, o que sugere uma relação causal entre ambas as alterações ⁽⁴⁰⁾. De maneira interessante, nossos achados entre os grupos sedentários não foram acompanhados de qualquer alteração no depósito de colágeno perivascular. A ausência de alteração no conteúdo total de colágeno na HAP pode ser parcialmente mediada pelo estágio estável da doença atingido pelos animais. Ainda, é possível que nesses animais, o remodelamento vascular tenha sido principalmente mediado por outros componentes, tais como elastina e fibronectina, que não foram avaliadas no presente estudo ⁽⁷²⁾. Destaca-se ainda, que a contagem total de depósito de colágeno não permite a diferenciação entre os tipos de fibras colágena, assim, é possível que qualquer aumento em fibras tipo I ou IV, por exemplo, tenham sido mascaradas ⁽¹¹⁾.

5.2 Efeito do TF combinado sobre o remodelamento vascular pulmonar no modelo experimental de HAP

Entre os benefícios observados pelo TF tanto em modelos experimentais quanto em pacientes com HAP, observa-se a redução da fibrose e inflamação no tecido vascular pulmonar, redução do depósito de colágeno nos vasos pulmonares e redução da espessura da túnica média. A melhora de alterações estruturais se reflete na melhora da função cardiovascular e respiratória, promovendo aumento na tolerância aos esforços físicos, e favorecendo positivamente para uma evolução clínica e maior independência funcional ⁽⁷³⁾.

Há evidências que mostram que a terapia combinada de exercícios físicos multimodais (TF aeróbio combinado ao TF resistido) diminuiu a progressão da

HAP, hospitalizações e mortalidade, benefícios vistos tanto em modelo experimental, quanto em humano ^(18, 39, 74). Dentre os benefícios observados diretamente na HAP, encontra-se a melhora em parâmetros ecocardiográficos e hemodinâmicos de PAPm e RVP, assim como aumento da força da musculatura respiratória, como também a capilarização dos pequenos e médios vasos da musculatura periférica ^(18, 39, 75). Assim, o TF combinado pode conferir efeitos adjuvantes e cardioprotetores no controle do remodelamento vascular pulmonar provocado pela MCT em modelo experimental de HAP ^(23, 64, 75).

Destaca-se, no entanto, que até o momento, o presente estudo foi o primeiro a investigar os efeitos do TF combinado sobre os parâmetros de remodelamento vascular pulmonar na HAP. Nesse sentido, observamos que o TF aeróbio (intervalado) associado ao resistido, foi efetivo em prevenir o aumento da espessura da túnica média nos animais com HAP. É possível que tal redução tenha sido parcialmente mediada pelo menor depósito de colágeno, visto que o grupo MCT-T apresentou redução dessa variável comparado aos seus pares sedentários. É interessante notar que mesmo que os animais com HAP sedentários (MCT-S) não tenham apresentado acúmulo de colágeno quando comparado aos controles saudáveis, os mesmos foram beneficiados pelo TF. Tendo em vista que o TF combinado resultou ainda em redução da RVP e da hipertrofia de câmara cardíaca direita, tais achados sugerem uma relação causal entre a melhora do remodelamento vascular pulmonar, a redução da RVP e por consequência, a menor sobrecarga imposta ao ventrículo direito proporcionados pelo TF na HAP.

Evidências em modelos experimentais de HAP demonstraram que o TF aeróbio exerce efeito anti-inflamatório e anti-fibrótico, além de regular os níveis de mRNA da ET-1 e VEGF perivascular e no VD ^(40, 57, 76). Ainda, o TF resistido mostrou-se efetivo em atenuar o depósito de colágeno e perfil inflamatório em modelo experimental de insuficiência cardíaca. Tendo o conhecimento de que esses processos inflamatórios e fibróticos participam do remodelamento vascular pulmonar na HAP, é possível que a atenuação dessas vias contribua para a redução da RVP e hipertrofia cardíaca, ambos marcadores de gravidade da doença na HAP.

Os benefícios estruturais e funcionais do TF observados em nosso estudo podem ser vinculados à modalidade intervalada adotada. Neste sentido, Brown et

al ⁽⁴⁰⁾ demonstrou que, em animais com HAP, o TF aeróbio intervalado promoveu benefícios hemodinâmicos e estruturais na vasculatura pulmonar e cardíaca superiores aos observados na modalidade contínua. Do ponto de vista da aplicabilidade da modalidade intervalada, a mesma é interessante para os pacientes com HAP ao permitir que uma maior intensidade de exercício seja atingida, promovendo maiores estímulo e adaptação aos sistemas cardiovascular e respiratório.

6 RELEVÂNCIA CLÍNICA

Dentre os protocolos de TF recomendado em diferentes *Guidelines* para Reabilitação Cardíaca e Pulmonar ^(38, 39), seguros e eficazes para HAP estável ⁽⁴⁰⁾, destaca-se a modalidade combinada (multimodal). Mais especificamente, serviços ambulatoriais de reabilitação utilizam da combinação de sessões aeróbias e sessões de exercício resistido. Nesse sentido, os achados apresentados demonstram que um protocolo com características similares à utilizada pelos pacientes com HAP é efetivo em normalizar parcialmente o remodelamento vascular pulmonar e, por consequência, atenuar alterações funcionais e estruturais que são marcadoras de gravidade da doença.

7 CONCLUSÃO

O modelo experimental de HAP por monocrotalina cursa com aumento da espessura da túnica média arteriolar pulmonar em comparação à animais saudáveis. Por outro lado, o TF combinado de moderada intensidade é efetivo em reduzir o depósito de colágeno total perivascular e prevenir o aumento da espessura arteriolar pulmonar em animais com HAP.

Os achados originais do presente estudo incentivam o TF combinado de moderada intensidade como estratégia terapêutica para melhora dos marcadores de remodelamento vascular pulmonar e de gravidade da doença mesmo em pacientes com HAP estáveis.

8. REFERÊNCIAS

1. 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.
2. Coons JC, Pogue K, Kolodziej AR, Hirsch GA, George MP. Pulmonary Arterial Hypertension: a Pharmacotherapeutic Update. *Curr Cardiol Rep*. 2019;21(11):141.
3. Sommer N, Ghofrani HA, Pak O, Bonnet S, Provencher S, Sitbon O, et al. Current and future treatments of pulmonary arterial hypertension. *Br J Pharmacol*. 2021;178(1):6-30.
4. Beshay S, Sahay S, Humbert M. Evaluation and management of pulmonary arterial hypertension. *Respir Med*. 2020;171:106099.
5. Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, et al. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(25 Suppl):D42-50.
6. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *European heart journal*. 2016;37(1):67-119.
7. Leber L, Beaudet A, Muller A. Epidemiology of pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: identification of the most accurate estimates from a systematic literature review. *Pulmonary circulation*. 2021;11(1):2045894020977300.
8. Hurdman J, Condliffe R, Elliot CA, Davies C, Hill C, Wild JM, et al. ASPIRE registry: assessing the Spectrum of Pulmonary hypertension Identified at a REferral centre. *The European respiratory journal*. 2012;39(4):945-55.
9. Tran DL, Lau EMT, Celermajer DS, Davis GM, Cordina R. Pathophysiology of exercise intolerance in pulmonary arterial hypertension. *Respirology*. 2018;23(2):148-59.

10. Malenfant S, Lebret M, Breton-Gagnon E, Potus F, Paulin R, Bonnet S, et al. Exercise intolerance in pulmonary arterial hypertension: insight into central and peripheral pathophysiological mechanisms. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*. 2021;30(160).
11. Thenappan T, Chan SY, Weir EK. Role of extracellular matrix in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2018;315(5):H1322-H31.
12. Wang A, Valdez-Jasso D. Cellular mechanosignaling in pulmonary arterial hypertension. *Biophys Rev*. 2021;13(5):747-56.
13. Manders E, Rain S, Bogaard HJ, Handoko ML, Stienen GJ, Vonk-Noordegraaf A, et al. The striated muscles in pulmonary arterial hypertension: adaptations beyond the right ventricle. *Eur Respir J*. 2015;46(3):832-42.
14. Wang T LY, Chen J, Xie L, Xiao T. TGF- β 1/Smad3 signaling promotes collagen synthesis in pulmonary artery smooth muscle by down-regulating miR-29b. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018 Dec 1;11(12):5592-5601. PMID: 31949646; PMCID: PMC6963096.
15. Spagnolo P, Distler O, Ryerson CJ, Tzouvelekis A, Lee JS, Bonella F, et al. Mechanisms of progressive fibrosis in connective tissue disease (CTD)-associated interstitial lung diseases (ILDs). *Ann Rheum Dis*. 2021;80(2):143-50.
16. Naeije R, Richter MJ, Rubin LJ. The physiological basis of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2022;59(6).
17. Siamwala JH, Zhao A, Barthel H, Pagano FS, Gilbert RJ, Rounds S. Adaptive and innate immune mechanisms in cardiac fibrosis complicating pulmonary arterial hypertension. *Physiol Rep*. 2020;8(15):e14532.
18. Grunig E, MacKenzie A, Peacock AJ, Eichstaedt CA, Benjamin N, Nechwatal R, et al. Standardized exercise training is feasible, safe, and effective in pulmonary arterial and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: results from a large European multicentre randomized controlled trial. *Eur Heart J*. 2021;42(23):2284-95.
19. 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.
20. Babu AS, Holland AE, Morris NR. Exercise-Based Rehabilitation to Improve Exercise Capacity and Quality of Life in Pulmonary Arterial Hypertension. *Phys Ther*. 2019;99(9):1126-31.

21. Soares LL, Leite LB, Ervilha LOG, Silva B, Freitas MO, Portes AMO, et al. Resistance Exercise Training Mitigates Left Ventricular Dysfunctions in Pulmonary Artery Hypertension Model. *Arq Bras Cardiol.* 2022;119(4):574-84.
22. Waller L, Kruger K, Conrad K, Weiss A, Alack K. Effects of Different Types of Exercise Training on Pulmonary Arterial Hypertension: A Systematic Review. *J Clin Med.* 2020;9(6).
23. Oliveira-Junior SA, Ogura AY, Carvalho MR, Martinez PF. Cardioprotective Effect of Resistance Exercise on Left Ventricular Remodeling Associated with Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension. *Arq Bras Cardiol.* 2022;119(4):585-6.
24. Chamorthy MR, Kandathil A, Kalva SP. Pulmonary vascular pathophysiology. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2018;8(3):208-13.
25. Humbert M, Guignabert C, Bonnet S, Dorfmüller P, Klinger JR, Nicolls MR, et al. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives. *The European respiratory journal.* 2019;53(1).
26. Crosswhite P, Sun Z. Molecular mechanisms of pulmonary arterial remodeling. *Mol Med.* 2014;20(1):191-201.
27. Shimoda LA, Laurie SS. Vascular remodeling in pulmonary hypertension. *J Mol Med (Berl).* 2013;91(3):297-309.
28. Ghigna M-R, Dorfmueller P. Pulmonary vascular disease and pulmonary hypertension. *Diagnostic Histopathology.* 2019;25(8):304-12.
29. Barreto AC, Franchi SM, Pereira AC, Lopes AA. [Pulmonary arterial hypertension. Physiopathology, genetic aspects and response to the chronic use of sildenafil]. *Arq Bras Cardiol.* 2005;85(2):147-54.
30. Gaikwad AV, Lu W, Dey S, Bhattarai P, Chia C, Larby J, et al. Vascular remodelling in idiopathic pulmonary fibrosis patients and its detrimental effect on lung physiology: potential role of endothelial-to-mesenchymal transition. *ERJ Open Res.* 2022;8(1).
31. Jujo T, Sakao S, Ishibashi-Ueda H, Ishida K, Naito A, Sugiura T, et al. Correction: Evaluation of the Microcirculation in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension Patients: The Impact of Pulmonary Arterial Remodeling on Postoperative and Follow-Up Pulmonary Arterial Pressure and Vascular Resistance. *PLoS One.* 2015;10(9):e0138040.

32. Fernandes CJ, Calderaro D, Assad APL, Salibe-Filho W, Kato-Morinaga LT, Hoette S, et al. Update on the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Arq Bras Cardiol.* 2021;117(4):750-64.
33. Chester AH, Yacoub MH. The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2014;2014(2):62-78.
34. Zahid KR, Raza U, Chen J, Raj UJ, Gou D. Pathobiology of pulmonary artery hypertension: role of long non-coding RNAs. *Cardiovasc Res.* 2020;116(12):1937-47.
35. Grunig E, Lichtblau M, Ehlken N, Ghofrani HA, Reichenberger F, Staehler G, et al. Safety and efficacy of exercise training in various forms of pulmonary hypertension. *The European respiratory journal.* 2012;40(1):84-92.
36. Rodriguez-Chiaradia DA, Khilzi K, Blanco I, Rodo-Pin A, Martin-Ontiyuelo C, Herranz Blasco A, et al. Effects of Exercise Training on Circulating Biomarkers of Endothelial Function in Pulmonary Arterial Hypertension. *Biomedicines.* 2023;11(7).
37. Paleviciute E, Celutkiene J, Simbelyte T, Gumbiene L, Jureviciene E, Zakarkaite D, et al. Safety and effectiveness of standardized exercise training in patients with pulmonary hypertension associated with heart failure with preserved ejection fraction (TRAIN-HFpEF-PH): study protocol for a randomized controlled multicenter trial. *Trials.* 2023;24(1):281.
38. 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.
39. Grunig E, Eichstaedt C, Barbera JA, Benjamin N, Blanco I, Bossone E, et al. ERS statement on exercise training and rehabilitation in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *The European respiratory journal.* 2019;53(2).
40. Brown MB, Neves E, Long G, Graber J, Gladish B, Wiseman A, et al. Highintensity 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.
41. Silva CMAFd, Sá KSGd, Gorla JI, Flores LJF, Silva MdPMe, Coswig VS, et al. Treinamento Intervalado De Alta Intensidade Em Pessoas Com Lesão Da Medula Espinhal: Revisão Sistemática. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte.* 2024;30.
42. Souza Neto EG, Peixoto JVC, Rank Filho C, Petterle RR, Fogaca RTH, Wolska BM, et al. Effects of High-Intensity Interval Training and Continuous Training on

Exercise Capacity, Heart Rate Variability and Isolated Hearts in Diabetic Rats. *Arq Bras Cardiol.* 2023;120(1):e20220396.

43. Wang C, Xing J, Zhao B, Wang Y, Zhang L, Wang Y, et al. The Effects of HighIntensity Interval Training on Exercise Capacity and Prognosis in Heart Failure and Coronary Artery Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cardiovasc Ther.* 2022;2022:4273809.

44. 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.

45. Long GM, Troutman AD, Gray DA, Fisher AJ, Lahm T, Coggan AR, et al. Skeletal muscle blood flow during exercise is reduced in a rat model of pulmonary hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2022;323(4):R561-R70.

46. Alves JP, Nunes RB, Stefani GP, Dal Lago P. Resistance training improves hemodynamic function, collagen deposition and inflammatory profiles: experimental model of heart failure. *PLoS One.* 2014;9(10):e110317.

47. Keusch S, Turk A, Saxer S, Ehlken N, Grunig E, Ulrich S, et al. Rehabilitation in patients with pulmonary arterial hypertension. *Swiss Med Wkly.* 2017;147:w14462.

48. Brown MB, Chingombe TJ, Zinn AB, Reddy JG, Novack RA, Cooney SA, et al. Novel assessment of haemodynamic kinetics with acute exercise in a rat model of pulmonary arterial hypertension. *Exp Physiol.* 2015;100(6):742-54.

49. Grunig E, Ehlken N, Ghofrani A, Staehler G, Meyer FJ, Juenger J, et al. Effect of exercise and respiratory training on clinical progression and survival in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Respiration.* 2011;81(5):394-401.

50. Zolty R. Pulmonary arterial hypertension specific therapy: The old and the new. *Pharmacol Ther.* 2020;214:107576.

51. Li YL, Ding Y, Agnew C, Schultz HD. Exercise training improves peripheral chemoreflex function in heart failure rabbits. *J Appl Physiol (1985).* 2008;105(3):782-90.

52. 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.

53. 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.

54. Urboniene D, Haber I, Fang YH, Thenappan T, Archer SL. Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010;299(3):L401-12.

55. Rodrigues B FD, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, De, K. A. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin -diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2007;6:38.

56. Sanches IC, Conti FF, Sartori M, Irigoyen MC, De Angelis K. Standardization of resistance exercise training: effects in diabetic ovariectomized rats. *Int J Sports Med*.

2014;35(4):323-9.

57. Abad CCC, do Nascimento AM, de Souza LE, Figueroa D, Ramona P, Sartori M, et al. Interval and continuous aerobic exercise training similarly increase cardiac function and autonomic modulation in infarcted mice. *J Exerc Rehabil*. 2017;13(3):257-

65.

58. Kay JM, Harris P, Heath D. Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. *Thorax*. 1967;22(2):176-9.

59. Yan CC, Huxtable RJ. Effect of the pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline, on bile composition of the isolated, perfused rat liver. *Life Sci*. 1995;57(6):617-26.

60. Jones JE, Mendes L, Rudd MA, Russo G, Loscalzo J, Zhang YY. Serial noninvasive assessment of progressive pulmonary hypertension in a rat model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(1):H364-71.

61. Sztuka K, Jasinska-Stroschein M. Animal models of pulmonary arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis of data from 6126 animals. *Pharmacol Res*. 2017;125(Pt B):201-14.

62. Gewehr DM, Salgueiro GR, Noronha L, Kubrusly FB, Kubrusly LF, Coltro GA, et al. Plexiform Lesions in an Experimental Model of Monocrotalin-Induced Pulmonary Arterial Hypertension. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2020;115(3):480-90.

63. da Silva Goncalves Bos D, Happe C, Schaliij I, Pijacka W, Paton JFR, Guignabert C, et al. Renal Denervation Reduces Pulmonary Vascular Remodeling and Right Ventricular Diastolic Stiffness in Experimental Pulmonary Hypertension. *JACC Basic Transl Sci*. 2017;2(1):22-35.

64. 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.
65. Dumitrascu R, Koebrich S, Dony E, Weissmann N, Savai R, Pullamsetti SS, et al. Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury. *BMC Pulm Med*. 2008;8:25.
66. Colombo R, Siqueira R, Becker CU, Fernandes TG, Pires KM, Valenca SS, et al. Effects of exercise on monocrotaline-induced changes in right heart function and pulmonary artery remodeling in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2013;91(1):38-44.
67. Hill NS, Gillespie MN, McMurtry IF. Fifty Years of Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension: What Has It Meant to the Field? *Chest*. 2017;152(6):1106-8.
68. Zimmer A, Teixeira RB, Constantin RL, Campos-Carraro C, Aparicio Cordero EA, Ortiz VD, et al. The progression of pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline is characterized by lung nitrosative and oxidative stress, and impaired pulmonary artery reactivity. *European journal of pharmacology*. 2021;891:173699.
69. Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, Farkas D, Kraskauskas D, Voelkel NF, et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;302(4):L363-9.
70. Zhang C, Sun Y, Guo Y, Xu J, Zhao H. JMJD1C promotes smooth muscle cell proliferation by activating glycolysis in pulmonary arterial hypertension. *Cell Death Discov*. 2023;9(1):98.
71. Frid MG, Aldashev AA, Dempsey EC, Stenmark KR. Smooth muscle cells isolated from discrete compartments of the mature vascular media exhibit unique phenotypes and distinct growth capabilities. *Circ Res*. 1997;81(6):940-52.
72. Klingberg F, Hinz B, White ES. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *The Journal of pathology*. 2013;229(2):298-309.
73. Soares LL, Drummond FR, Lavorato VN, Carneiro-Junior MA, Natali AJ. Exercise training and pulmonary arterial hypertension: A review of the cardiac benefits. *Science & Sports*. 2018;33(4):197-206.
74. Soares LL, Drummond FR, Rezende LMT, Lopes Dantas Costa AJ, Leal TF, Fidelis MR, et al. Voluntary running counteracts right ventricular adverse remodeling and myocyte contraction impairment in pulmonary arterial hypertension model. *Life Sci*. 2019;238:116974.

75. Gomes MJ, Pagan LU, Lima ARR, Reyes DRA, Martinez PF, Damatto FC, et al. Effects of aerobic and resistance exercise on cardiac remodelling and skeletal muscle oxidative stress of infarcted rats. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2020;24(9):5352-62.
76. Mansoor AM, Honda M, Saida K, Ishinaga Y, Kuramochi T, Maeda A, et al. Endothelin induced collagen remodeling in experimental pulmonary hypertension. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;215(3):981-6.

APÊNDICE I

ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO COMO CO-AUTORA

Brazilian Journal of Physical Therapy

Respiratory, cardiovascular and musculoskeletal mechanisms involved in the pathophysiology of pulmonary hypertension: An updated systematic review of preclinical and clinical studies

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Review Article
Keywords:	pulmonary hypertension; exercise capacity; skeletal muscles; respiratory muscles; hemodynamic.
Corresponding Author:	Marcelle Paula-Ribeiro, PhD Federal University of Sao Paulo Sao Paulo, Outside North America BRAZIL
First Author:	Thaís Freire
Order of Authors:	Thaís Freire Marília Ferreira Katia De Angelis, PhD Marcelle Paula-Ribeiro, PhD
Abstract:	Background: Progressive exercise intolerance is a hallmark in pulmonary hypertension (PH) and severely impacts patients' independence and quality of life. In the last decade, accumulating evidence has shown that combined abnormalities in the peripheral reflexes and target organs contributes to the disease progression and exercise intolerance in this population. Objective: This study reviewed the last decade's literature on PH-related cardiovascular, respiratory, and musculoskeletal alterations involved to its pathophysiology and exercise intolerance. Methods: Searches were conducted in the PubMed, SciELO and Cochrane Library databases for original articles published between 2013-2023. Studies conducted in experimental models or humans, with randomized controlled or non-randomized controlled and non-controlled (pre-post) designs were included. Results: Twenty five studies were considered eligible. Pre-clinical and clinical studies showed that PH leads to functional and structural changes in the respiratory, cardiovascular and musculoskeletal systems. Moreover, afferent pathways from baroreflex and chemoreflex seem to contribute to changes in the target organs responsible for exercise intolerance in PH. Potential therapeutic targets suggested by the studies include the manipulation of the peripheral baroreflex and chemoreflex, the improvement in cardiovascular autonomic control via cardiac vagal control as well as specific pathways, such as GPER1, GDF-15, miR-126 and the JMJD1C gene. Conclusion: Information published in the last 10 years corroborates the integrated nature of the PH physiopathology via functional and structural changes in the peripheral reflexes, respiratory, cardiovascular and musculoskeletal systems. These findings suggest future therapeutic targets that can assist in improving exercise tolerance and quality of life in patients with PH.

ANEXO I APROVAÇÃO CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do treinamento físico sob a contribuição dos aferentes quimiorreceptores carotídeos para as disfunções autonômica, cardíaca e vascular pulmonar na Hipertensão Arterial Pulmonar: uma perspectiva translacional", protocolada sob o CEUA nº 5905261120 (ID 010330), sob a responsabilidade de **Marcelle de Paula Ribeiro e equipe**; Prof^a. Dra. Kátia De Angelis; Maycon Junior Ferreira; Danielle da Silva Dias; Camila Paixão dos Santos; Sérgio Luiz Domingues Cravo; Andrey Jorge Serra - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 16/12/2020.

We certify that the proposal "The effect of exercise training on the contribution of carotid chemoreceptors to autonomic, cardiac and pulmonary vascular dysfunction in pulmonary arterial hypertension: a translational perspective", utilizing 78 Heterogenics rats (78 males), protocol number CEUA 5905261120 (ID 010330), under the responsibility of **Marcelle de Paula Ribeiro and team**; Prof^a. Dra. Kátia De Angelis; Maycon Junior Ferreira; Danielle da Silva Dias; Camila Paixão dos Santos; Sérgio Luiz Domingues Cravo; Andrey Jorge Serra - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 12/16/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de 01/2021 a 12/2022

Área: **Medicina Translacional/medicina**

Origem: **CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **2 a 3 meses**

N: **78**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **220 a 250 g**

Local do experimento: Os animais serão mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia (5º andar) da Universidade Federal de São Paulo e os experimentos serão realizados no Laboratório de Fisiologia do Exercício, no Departamento de Fisiologia (5º andar) desta mesma Instituição.

São Paulo, 17 de dezembro de 2020

Prof. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dra. Daniela Santoro Rosa
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo