

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

**THAIS DE CARVALHO FREIRE**

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO COMBINADO SOBRE OS INDICADORES  
DE ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO NA MUSCULATURA  
ESQUELÉTICA PERIFÉRICA E RESPIRATÓRIA EM MODELO EXPERIMENTAL  
DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR**

**SÃO PAULO  
2023**

**THAIS DE CARVALHO FREIRE**

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO COMBINADO SOBRE OS INDICADORES  
DE ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO NA MUSCULATURA  
ESQUELÉTICA PERIFÉRICA E RESPIRATÓRIA EM MODELO EXPERIMENTAL  
DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR**

Dissertação de Mestrado apresentado junto ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação (Mestrado) da Universidade Nove de Julho para obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação.

Orientadora: Profa. Dra. Kátia De Angelis

Coorientadora: Profa. Dra. Marcelle Ribeiro

**SÃO PAULO**

**2023**

Freire, Thais de Carvalho.

Efeito do treinamento físico combinado sobre os indicadores de estresse oxidativo e inflamação na musculatura esquelética periférica e respiratória em modelo experimental de hipertensão arterial pulmonar. / Thais de Carvalho Freire. 2023.

69 f.

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

Orientador (a): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Kátia de Angelis.

1. Hipertensão arterial pulmonar. 2. Estresse oxidativo. 3. Mediadores inflamatórios. 4. Treinamento físico combinado.
- I. Angelis, Kátia de. II. Título

CDU 615.8

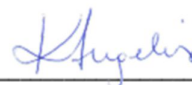
São Paulo, 13 de dezembro de 2023.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno (a): THAIS DE CARVALHO FREIRE

Título da Dissertação: "EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO COMBINADO SOBRE OS INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA PERIFÉRICA E RESPIRATÓRIA EM MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR"

Presidente: PROFA. DRA. KÁTIA DE ANGELIS LOBO DAVILA



Membro: PROFA. DRA. LUCIANA MARIA MALOSÁ SAMPAIO JORGE



Membro: PROF. DR. GABRIEL DIAS



## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minha família. Aos meus pais, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, honestidade, amor, carinho, apoio e força para nunca desistir dos meus objetivos e sonhos. A família, que se doa e renuncia aos seus sonhos, para realizar os meus, o meu eterno amor e gratidão por tudo.

“... Enquanto houver você do outro lado  
Aqui do outro eu consigo me orientar  
...Metade de mim agora é assim  
De um lado a poesia, o verbo,  
Do outro, a luta  
Força e coragem pra chegar no fim.”  
(O teatro mágico)

## AGRADECIMENTOS

Ao final desta etapa, feita por momentos bons e outros não bons assim, pude contar com o apoio de pessoas que me ajudaram a alcançar essa vitória, e por isso merecem meu agradecimento, meu respeito e minha admiração...

... A Deus, por ter iluminado e trilhado o meu caminho, por ter ouvido minhas preces e orações, e por sempre estar ao meu lado.

... Meus pais, Renato e Elvina, que me incentivaram a prosseguir na minha caminhada; que deixaram de realizar alguns de seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Obrigada, sem vocês nada seria possível.

... Ao meu irmão, Evanilson, que sempre esteve presente, me ajudando, me apoiando; incentivando. Obrigada por tanto!

... A minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kátia De Angelis e minha coorientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marcelle Paula Ribeiro, pela atenção, paciência, ajuda e por toda dedicação em transmitir os seus conhecimentos. Obrigada por todo apoio, inspiração e ensinamentos inestimável.

... Aos amigos de Laboratório que se fizeram presentes e dispostos, expresse meu carinho e gratidão pelos momentos compartilhados, em especial aos queridos colegas Danielle da Silva Dias, Antônio Viana Nascimento, Pietra Petrica Neves, Marina Rascio Henriques Dutra e Victor Hugo Martins que não pouparam esforços para ajudar.

... A todos os amigos, professores, coordenadores, secretários e funcionários que direta ou indiretamente influenciaram minha vida, ao Bruno Nascimento, por toda ajuda e por compartilhar dos seus conhecimentos com tanta maestria. A Ellen, Adriana e Ana Paula por me apoiarem e ajudarem na escala e plantões noturnos e por perdoarem minha ausência e recusas para sair ao longo desse ano.

... Ao apoio da Universidade Nove de Julho e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

... Aos ratinhos que fizeram parte da minha amostra experimental, pois eles tornaram este estudo possível.

"Sozinho podemos fazer tão pouco,

juntos podemos fazer muito..."

Helen Keller (1880-1968)

## RESUMO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença progressiva e com prognóstico desfavorável, caracterizada por vasoconstrição pulmonar e remodelamento vascular pulmonar progressivo. Na HAP, o treinamento físico combinado (TF) (i.e, a associação do aeróbio com o resistido), é recomendado como ferramenta adjuvante no tratamento de pacientes estáveis. Os objetivos desta dissertação foram revisar os mecanismos respiratórios, cardiovasculares envolvidos na fisiopatologia da HAP (estudo I), bem como avaliar o efeito do TF combinado sobre as variáveis de estresse oxidativo (EO) e mediadores inflamatórios na musculatura esquelética periférica e respiratória em modelo experimental de HAP (estudo II). No estudo I foi conduzida uma revisão sistemática de estudos pré-clínicos e clínicos nos últimos 10 anos que corroboram o caráter integrado da fisiopatologia da HP por meio de alterações funcionais e estruturais nos reflexos periféricos, nos sistemas respiratório, cardiovascular e musculoesquelético. Os achados sugerem futuros alvos terapêuticos que podem auxiliar na melhoria da tolerância ao exercício e da qualidade de vida em pacientes com HAP. No estudo II, conduzimos um protocolo original, em que ratos Wistar receberam injeção subcutânea de MCT (40 µg/kg de peso corporal) ou salina e foram divididos após 4 semanas nos grupos TF: MCT<sub>TF</sub> e SAL<sub>TF</sub> (aeróbio: 40-60%  $Vel_{max}$ , 3x/semana; resistido: 40-60%  $Carga_{max}$ , 2x/semana) ou grupos sedentários: MCT<sub>SED</sub> e SAL<sub>SED</sub>. Os músculos gastrocnêmio e diafragma foram avaliados para os marcadores de dano oxidativo (lipoperoxidação e proteínas carboniladas), antioxidantes (catalase, superóxido dismutase, FRAP) e pró-oxidantes (peróxido de hidrogênio, NADPH Oxidase) e marcadores inflamatórios (interleucinas IL-6 e IL-10 e TNF- $\alpha$ ). A HAP cursou com redução de defesa antioxidante no gastrocnêmio e aumento de pró-oxidantes e dano oxidativo em ambos os músculos. Houve redução de mediador pró-inflamatório (TNF- $\alpha$ ) no músculo gastrocnêmio e aumento de mediadores pro-inflamatórios e redução de mediadores anti-inflamatórios no diafragma. O TF, por outro lado, normalizou parcialmente o balanço redox na musculatura periférica e respiratória e os mediadores inflamatórios na musculatura respiratória na HAP. Em conjunto os resultados reforçam o entendimento da literatura atual de que a fisiopatologia da HAP envolve não só os sistemas cardiovascular e pulmonar, englobando também o sistema musculoesquelético. Além disto, dados originais apresentados no estudo II corroboram o entendimento de que as alterações no perfil inflamatório e no balanço redox ocorrem na musculatura periférica e respiratória na HAP estável e apontam o TF combinado de moderada intensidade como estratégia terapêutica eficaz em prevenir tais alterações.

**Palavras-chave:** Hipertensão arterial pulmonar, estresse oxidativo, mediadores inflamatórios, treinamento físico combinado.

## ABSTRACT

The Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a progressive disease with an unfavorable prognosis, characterized by pulmonary vasoconstriction and progressive pulmonary vascular remodeling. In PAH, combined physical training (CT) (i.e., the combination of aerobic and resistance training) is recommended as an adjuvant tool in the treatment of stable patients. The objectives of this dissertation were to review the respiratory and cardiovascular mechanisms involved in the pathophysiology of PAH (Study I) and to evaluate the effect of combined CT on oxidative stress (OS) variables and inflammatory mediators in peripheral and respiratory skeletal muscles in an experimental model of PAH (Study II). In Study I, a systematic review of pre-clinical and clinical studies in the last 10 years was conducted, supporting the integrated nature of PAH pathophysiology through functional and structural changes in peripheral reflexes, respiratory, cardiovascular, and musculoskeletal systems. Findings suggest future therapeutic targets that may improve exercise tolerance and quality of life in PAH patients. In Study II, we conducted an original protocol where Wistar rats received subcutaneous injection of MCT (40 µg/kg body weight) or saline and were divided into groups after 4 weeks: CT groups (MCTCT and SALCT - aerobic: 40-60% MaxSpeed, 3x/week; resistance: 40-60% MaxLoad, 2x/week) and sedentary groups (MCTSED and SALSED). Gastrocnemius and diaphragm muscles were assessed for oxidative damage markers (lipid peroxidation and carbonylated proteins), antioxidants (catalase, superoxide dismutase, FRAP), and pro-oxidants (hydrogen peroxide, NADPH oxidase), as well as inflammatory markers (interleukins IL-6 and IL-10 and TNF- $\alpha$ ). PAH resulted in reduced antioxidant defense in the gastrocnemius and increased pro-oxidants and oxidative damage in both muscles. There was a reduction in the pro-inflammatory mediator (TNF- $\alpha$ ) in the gastrocnemius and an increase in pro-inflammatory mediators and a decrease in anti-inflammatory mediators in the diaphragm. CT, on the other hand, partially normalized the redox balance in peripheral and respiratory muscles and the inflammatory mediators in respiratory muscles in PAH. In conclusion, the results reinforce the current understanding that PAH pathophysiology involves not only the cardiovascular and pulmonary systems but also the musculoskeletal system. Furthermore, original data presented in Study II support the understanding that changes in the inflammatory profile and redox balance occur in stable PAH and indicate moderate-intensity combined CT as an effective therapeutic strategy to prevent such alterations.

**Keywords:** Pulmonary arterial hypertension, oxidative stress, inflammatory mediators, combined physical training.



## SUMÁRIO

1 CONTEXTUALIZAÇÃO .....	11
1.1 Papel do estresse oxidativo e inflamação na fisiopatologia da HAP .....	13
1.2 Efeito do treinamento físico sobre os mediadores de estresse oxidativo e inflamação.	16
2 OBJETIVOS .....	18
2.1 Objetivos Gerais.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3 RESULTADOS .....	19
3.1 ESTUDO I.....	20
3.1.1 INTRODUCTION .....	20
3.1.2 METHODS.....	20
3.1.3 RESULTS.....	21
3.1.4 DISCUSSION.....	26
3.1.5 CONCLUSION .....	29
Figure 1. ....	30
Table 1.....	31
3.2 ESTUDO II.....	43
3.2.1 INTRODUÇÃO .....	43
3.2.1 MATERIAL E MÉTODOS .....	44
Amostra e Protocolo Experimental.....	44
Amostra e desenho experimental:.....	45
3.2.3 PROTOCOLO.....	45
3.2.4 AVALIAÇÕES .....	46
Procedimentos experimental .....	46
Teste de tolerância ao esforço máximo .....	46

Treinamento físico .....	46
Eutanásia dos animais .....	47
Avaliações de Mediadores Inflamatórios .....	47
Avaliações de Estresse Oxidativo .....	47
3.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	48
3.2.6 RESULTADOS .....	48
Indicadores do estabelecimento de hipertensão arterial pulmonar .....	48
Estresse oxidativo no músculo gastrocnêmio .....	49
Estresse oxidativo no músculo diafragma .....	51
Mediadores Inflamatórios no músculo gastrocnêmio .....	52
Mediadores Inflamatórios no músculo diafragma .....	53
3.2.7 DISCUSSÃO .....	54
Modelo de HAP por MCT .....	55
Efeito do TF combinado sobre os marcadores de inflamação e de estresse oxidativo ..	55
3.2.8 CONCLUSÃO .....	57
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	58
5 REFERÊNCIAS .....	59
6 ANEXOS .....	69

## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença de caráter progressivo, definida pelas seguintes medidas por cateterismo direito: pressão arterial pulmonar média (PAPm)  $\geq 20$  mmHg em repouso, pressão de oclusão da artéria pulmonar (PoAp) menor ou igual 15 mmHg e resistência vascular pulmonar (RVP) superior a 3 unidades Wood <sup>(1)</sup>. Corresponde ao grupo 1 da Hipertensão Pulmonar (HP), engloba diversas etiologias, como a idiopática, associada a doenças do tecido conjuntivo, induzida por toxinas e drogas, relacionada à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), esquistossomose, doença tromboembólica crônica, ou a forma hereditária <sup>(1,2)</sup>. A definição hemodinâmica da HP diferencia HP pós-capilar e HP pré-capilar, sendo subdividida em HP combinada e isolada, de acordo com diferentes combinações de pressões da artéria pulmonar, pressão de oclusão da artéria pulmonar (PoAp), débito cardíaco, gradiente de pressões diastólica e resistência vascular pulmonar (RVP). Essa estratificação é crucial para compreender a fisiopatologia da doença e, por conseguinte, orientar a abordagem e tratamento adequados (Tabela 1) <sup>(1-4)</sup>.

As estimativas atuais sugerem que a prevalência de HAP seja de aproximadamente 10,6 casos por 1 milhão de adultos nos EUA <sup>(5)</sup>. Apesar da baixa prevalência e dos avanços no desenvolvimento de novos fármacos para seu tratamento, o prognóstico desses pacientes ainda é desfavorável, com taxa de mortalidade estimada em 30% nos 3 primeiros anos da doença <sup>(6)</sup>, o que demonstra a necessidade de estudos científicos que abordem potenciais estratégias terapêuticas para essa população.

O curso temporal da HAP é caracterizado por vasoconstrição pulmonar patológica e remodelamento vascular pulmonar progressivo <sup>(7)</sup>. Tais alterações cursam com o aumento progressivo da RVP e da PAPm, levando à insuficiência ventricular direita e, conseqüentemente, ao óbito <sup>(7,8)</sup>. Os principais sintomas iniciais observados na HAP incluem dispnéia progressiva, assim como fadiga muscular, dor torácica e síncope <sup>(9)</sup>. Com a progressão da doença, indivíduos com HAP demonstram caquexia, fraqueza da musculatura periférica e inspiratória e progressiva intolerância ao exercício físico; sintomas esses associados à piora clínica e redução significativa na qualidade de vida <sup>(10)</sup>.

Alterações no perfil inflamatório e de estresse oxidativo podem estar envolvidos na fisiopatologia e progressão da HAP. Nesse sentido, é sabido que o estresse oxidativo – caracterizado pelo desbalanço entre mediadores pró-oxidantes e antioxidantes – na vasculatura pulmonar pode mediar o aumento da RVP e PAPm via remodelamento arteriolar pulmonar na HAP <sup>(11)</sup>. Adicionalmente, um corpo recente de evidências tem demonstrado que o estresse oxidativo na musculatura esquelética periférica e respiratória também participa de maneira

importante da progressão dessa doença<sup>(12-15)</sup>. Por exemplo, Moreira-Gonçalves et al<sup>(15)</sup> demonstraram que o aumento do estresse oxidativo e perfil inflamatório pode ser um dos mediadores da caquexia e atrofia muscular periférica no modelo experimental de HAP. Ainda, a fraqueza da musculatura inspiratória – alteração bem estabelecida em pacientes com HAP – parece ser parcialmente mediada pelo aumento de citocinas inflamatórias (tais como TNF- $\alpha$  e IL-1) que promovem a degradação dos filamentos de actina e disfunção contrátil do diafragma<sup>(12, 13)</sup>. Por fim, tendo o conhecimento de que o aumento do estresse oxidativo e inflamação podem mediar a atrofia muscular periférica e respiratória, tal alteração parece também contribuir para a redução da capacidade de exercício nessa população<sup>(16, 17)</sup>.

**Tabela 1. Definições hemodinâmicas de Hipertensão Pulmonar (HP)**

<b>Definições</b>	<b>Características</b>	<b>Grupos clínicos #</b>
<b>HP pré-capilar</b>	PAPm >20 mmHg	I.HAP III. HP devido à doença pulmonar IV. HP crônica tromboembólica V. HP de causa incerta e/ou multifatorial
	PAWP $\leq$ 15 mmHg	
	PVR $\geq$ 3 WU	
<b>HP pós-capilar isolado (IPcPH)</b>	PAPm >20 mmHg	II. HP devido à doença cardíaca esquerda V. HP de causa incerta e/ou multifatorial
	PAWP >15 mmHg	
	PVR <3 WU	
<b>HP pré e pós-capilar combinado (CpcPH)</b>	PAPm >20 mmHg	II. HP devido à doença cardíaca esquerda V. HP de causa incerta e/ou multifatorial
	PAWP >15 mmHg	
	PVR $\geq$ 3 WU	

PAWP: pressão de oclusão arterial pulmonar; RVP: resistência vascular pulmonar; WU: Unidade Wood. # : grupo 1: HAP; grupo 2: HP por cardiopatia esquerda; grupo 3: HP por doenças pulmonares e/ou hipóxia; grupo 4: HP por obstrução de artéria pulmonar; grupo 5: HP com mecanismos pouco claros e/ou multifatoriais. (Adaptado Simonneau, G erald et al.<sup>(1)</sup>).

Por outro lado, o treinamento físico é considerado um tratamento adjuvante para melhora dos parâmetros clínicos em pacientes com HAP<sup>(18)</sup>. Dentre os benefícios observados pelo treinamento físico estão a diminuição da PAPm e aumento do débito cardíaco. Tal redução da PAPm sugere uma diminuição do tônus vascular pulmonar, caracterizando um possível remodelamento nos vasos pulmonares<sup>(19)</sup>. Ainda, em estudo publicado por Vieira et al. (2020)<sup>(20)</sup>, realizado em modelo experimental de HAP induzida por monocrotalina (MCT), observou-se que o treinamento físico aeróbico contínuo iniciado antes do estabelecimento da HAP preveniu a disfunção muscular periférica, reverteu a disfunção e remodelamento cardíaco do ventrículo esquerdo e preveniu a intolerância ao exercício.

Especificamente em pacientes com HAP, ensaios clínicos 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, qualidade de vida e, por consequência, na sobrevivência desses pacientes<sup>(21, 22)</sup>. Dentre os protocolos de TF recomendados em diferentes *Guidelines* para Reabilitação Cardíaca e Pulmonar<sup>(23, 24)</sup> seguros e eficazes para HAP estável<sup>(25)</sup> e demais doenças cardiorrespiratórias<sup>(26, 27)</sup>, destaca-se a modalidade combinada (i.e, a associação do aeróbico com o resistido). A modalidade de TF intervalada (i.e, curtos períodos de moderada intensidade seguidos de recuperação em baixa intensidade) permite ao paciente atingir cargas superiores com menor sobrecarga cardiocirculatória<sup>(26)</sup>, e é constantemente utilizada na prática clínica em conjunto ao resistido dinâmico nessa população<sup>(25, 28)</sup>.

No entanto, permanece desconhecido o papel do TF combinado sobre os marcadores de estresse oxidativo e inflamação na musculatura periférica e diafragmática no modelo experimental de HAP.

### **1.1 Papel do estresse oxidativo e inflamação na fisiopatologia da HAP**

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes, como as Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em relação a atuação dos sistemas de defesa antioxidante<sup>(29)</sup>. O excesso de oxidantes causa danos teciduais por oxidação de estruturas celulares. Dentre os mecanismos que promovem dano tecidual, destaca-se o processo de peroxidação lipídica, que promove oxidação da membrana lipídica celular, inclusive com capacidade de promover danos ao DNA<sup>(30, 31)</sup>.

A oxidação é parte fundamental da vida e do metabolismo aeróbico<sup>(32)</sup>. A geração de energia necessária ao metabolismo celular ocorre essencialmente na cadeia respiratória mitocondrial<sup>(29)</sup>. No decorrer deste processo, a molécula de oxigênio é reduzida até ser

transformada em água<sup>(33)</sup>. Durante este processo de redução, ocorre a formação de uma série de elementos tóxicos e ROS<sup>(29, 34)</sup>. As ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) são radicais livres intimamente relacionados ao estresse oxidativo<sup>(35)</sup>. Atualmente, existem várias técnicas para avaliar o estresse oxidativo, que se baseiam na avaliação em fluídos corporais ou tecidos de produtos de oxidação de biomoléculas (lipoperoxidação ou dano à proteína) e de promotores (produtores ou produção de espécies reativas de oxigênio) ou inibidores (antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos) de lesão.

Um número crescente de evidências sugere que a produção aumentada de radicais livres ou ROS, como o ânion superóxido e o radical hidroxila, participam criticamente da patogênese das doenças coronarianas, hipertensão, aterosclerose e síndrome metabólica<sup>(36)</sup>. Vale lembrar que o óxido nítrico (NO) pode ser captado pelo radical superóxido<sup>(37)</sup> e poderá ser protegido por mecanismos antioxidantes que tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicais<sup>(38)</sup>. Esse sistema, usualmente, é dividido em enzimático como a enzima superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) e o sistema não enzimático (constituído por grande variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena ou dietética)<sup>(29, 39)</sup>.

O estresse oxidativo é identificado em diversas condições patológicas severas, tais como a HAP<sup>(11, 40)</sup>. Especificamente, evidências apontam o estresse oxidativo como um mediador da hipertensão pulmonar e das mudanças patológicas associadas à vasculatura pulmonar, ventrículo direito<sup>(11)</sup>, musculatura esquelética periférica e respiratória<sup>(12, 15)</sup>.

Em um estudo desenvolvido por Farahmand et al. (2004)<sup>(41)</sup>, mudanças no estresse oxidativo do coração de ratos Wistar tratados com MCT foram acompanhadas nos períodos de uma, duas e seis semanas. Os autores observaram que a sexta semana pós-estabelecimento da HAP foi acompanhada de redução significativa de enzimas antioxidantes e hipertrofia no coração desses animais. Tal alteração estrutural foi também acompanhada de anormalidades tanto na função sistólica, como na diastólica do ventrículo direito. Esses resultados sugerem, portanto, que o estresse oxidativo pode estar altamente envolvido na patogênese da disfunção ventricular direita em ratos com hipertensão pulmonar, tendo os antioxidantes um grande papel na preservação da função cardíaca<sup>(41)</sup>. Além disso, o aumento de NAPH oxidase, uma importante fonte de espécie reativa de oxigênio, foi observado em modelos experimentais de insuficiência cardíaca<sup>(42)</sup>. Especificamente na HAP, está bem documentado que o seu aumento<sup>(43)</sup> e de demais ROS no coração e vasculatura pulmonar participam da progressão da doença<sup>(33)</sup>.

O processo inflamatório sistêmico e de órgãos alvo também participa da fisiopatologia da HAP, visto que o endotélio íntegro desempenha um papel protetor no vaso sanguíneo. Essa ação protetora acontece através de estímulos fisiológicos, como o estresse de cisalhamento, exercido pelo fluxo sanguíneo laminar sobre as células endoteliais, que resulta na formação de óxido nítrico (NO), cuja função é manter o vaso sanguíneo em um estado constante de vasodilatação<sup>(44)</sup>. Por outro lado, a endotelina-1 (ET-1) age em sentido oposto ao NO, com efeito vasoconstritor<sup>(45)</sup>. O processo inflamatório vascular crônico está relacionado fundamentalmente com a capacidade do endotélio de secretar citocinas pró-inflamatórias, fatores e moléculas de adesão<sup>(46)</sup>. Algumas citocinas e fatores, como Interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), respectivamente, são liberados pelo endotélio e estimulam moléculas de adesão, aumentando o risco vascular<sup>(47)</sup>.

Em estudos com pacientes com HAP, bem como em ratos com HAP induzida por MCT foi observado níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias circulantes, como IL-6 e fator de TNF- $\alpha$ <sup>(40, 48)</sup>. Reid et al.<sup>(49)</sup> demonstraram, em camundongos adultos, que as citocinas iniciam a lesão do músculo estriado, prejudicam a função da proteína contrátil e estimulam a proteólise. A inflamação sistêmica também pode estar envolvida no desenvolvimento da fraqueza do diafragma na HAP, visto que se espera que as alterações no diafragma e nos músculos esqueléticos periféricos compartilhem um alto grau de similaridade e, até certo ponto, se desenvolvam simultaneamente<sup>(60)(49, 50)</sup>

Na musculatura periférica, evidências demonstram que o aumento na formação de ROS pode desencadear a degradação contrátil e atrofia muscular<sup>(12, 15, 48, 50)</sup>, participando, portanto, do quadro de caquexia e fadiga muscular observada em pacientes com HAP. Essas alterações também parece desencadear a atividade de macrófagos, levando à lesão tecidual e por consequente, à redução da capacidade de exercício<sup>(16)</sup>. De fato, a redução da tolerância ao exercício é fator prognóstico negativo da HAP, porém, não é totalmente explicada pela disfunção cardíaca, o que sugere que, além dos sistemas cardiovascular e pulmonar, alterações no sistema musculoesquelético também contribuem para a intolerância ao exercício na HAP<sup>(51, 52)</sup>. Adicionalmente, o aumento de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, promovem a degradação de sarcômeros de actina, que por sua vez, poderiam estar relacionados a disfunção contrátil durante o exercício em condições clínicas<sup>(53)</sup>. De fato, em modelo experimental de insuficiência cardíaca, observou-se a redução da atividade de enzimas antioxidantes na musculatura periférica<sup>(54)</sup>.

Em conjunto, os achados supracitados demonstram o papel do estresse oxidativo e inflamação como um dos mecanismos chaves para o desenvolvimento e progressão da doença.

Assim, protocolos experimentais e intervenções que busquem modular essas alterações na HAP fazem-se necessários.

## **1.2 Efeito do treinamento físico sobre os mediadores de estresse oxidativo e inflamação na HAP**

O treinamento físico (TF) aeróbio associado ao resistido dinâmico é recomendado como ferramenta não farmacológica adjuvante no tratamento de pacientes com HAP estáveis <sup>(19, 55)</sup>. Nesse sentido, ensaios clínicos demonstraram a eficácia e segurança de protocolos supervisionados como parte de um programa de reabilitação, resultando em melhora de parâmetros clínicos, tais como a força da musculatura respiratória, função cardiopulmonar e muscular e capacidade do exercício <sup>(19)</sup>. Tais parâmetros possuem impacto direto na qualidade de vida e sobrevida desses pacientes <sup>(21, 56)</sup>.

O exercício físico crônico também possui estabelecido efeito benéfico sobre a modulação do balanço redox e inflamação, como demonstrado em diferentes populações clínicas <sup>(14, 57-59)</sup>. Por exemplo, em modelo experimental de insuficiência cardíaca, o TF aeróbio reduziu a atividade pró-oxidante (via NADPH oxidase) no músculo diafragma quando comparado a animais sedentários <sup>(58)</sup>. Ainda, em pacientes com insuficiência cardíaca esquerda, o TF aeróbio de baixa intensidade resultou em mudanças moleculares e funcionais benéficas, incluindo melhora da função oxidativa da musculatura periférica e maior número e densidade mitocondrial <sup>(59)</sup>.

Especificamente na HAP, o corpo crescente de evidências tem demonstrado o efeito benéfico do TF aeróbio no balanço redox e redução do perfil inflamatório <sup>(60-62)</sup>. Becker et al. (2022) <sup>(14)</sup>, por exemplo, relataram aumento do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) no músculo gastrocnêmio de animais tratados com MCT e sedentários quando comparados à animais MCT e expostos ao TF aeróbio. De maneira similar, outros estudos demonstraram que, em animais com MCT expostos ao TF aeróbio, o dano oxidativo no gastrocnêmio diminuiu significativamente para os níveis do grupo sedentário controle, indicando que o TF aeróbio preveniu o dano oxidativo no músculo esquelético causado pela HAP <sup>(14, 57)</sup>. Benefícios do TF aeróbio sobre o balanço redox e inflamação também foram observados no pulmão (via redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de animais com HAP <sup>(60)</sup>.

Destaca-se, no entanto, a ausência de protocolos experimentais que tenham utilizado o TF aeróbio combinado ao resistido, para investigar os marcadores de estresse oxidativo e inflamação nessa população; tal fato caracteriza a lacuna do presente estudo. Dentre as modalidades de TF aeróbio aplicadas na HAP, a modalidade de TF intervalada (i.e, curtos



períodos de moderada intensidade seguidos de recuperação em baixa intensidade) permite ao paciente atingir cargas superiores com menor sobrecarga cardiocirculatória <sup>(26)</sup>, e é constantemente utilizada na prática clínica em conjunto ao resistido dinâmico nessa população (25, 28).

Assim, tendo o conhecimento de que: 1) o aumento do estresse oxidativo e o perfil inflamatório da musculatura periférica e respiratória participa da progressão da HAP e 2) a modalidade de TF combinado é a estratégia mais utilizada tanto nos serviços de reabilitação hospitalar quanto domiciliar para a HAP; faz-se necessário investigar os efeitos dessa modalidade de TF sobre o balanço redox e inflamação da musculatura periférica e diafragmática no modelo experimental de HAP.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos Gerais**

Revisar na literatura os mecanismos respiratórios, cardiovasculares e respiratórios envolvidos na HAP, bem como avaliar o efeito do TF combinado sobre os parâmetros de estresse oxidativo e inflamação da musculatura esquelética periférica e respiratória em modelo experimental de HAP.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Para cumprir com os objetivos propostos esta dissertação foi dividida em dois estudos cujos objetivos são descritos a seguir.

Estudo I. Revisar, por meio de uma revisão sistemática de estudos pré-clínicos e clínicos, os mecanismos respiratórios, cardiovasculares e musculares envolvidos na HAP;

Estudo II. Investigar e comparar, por meio de um estudo original, na musculatura esquelética (gastrocnêmio) e respiratória (diafragma) de ratos com HAP induzida por MCT e de ratos controle (salina), treinados e sedentários:

- a) estresse oxidativo: por avaliações de dano oxidativo (Lipoperoxidação por TBARS, proteínas oxidadas por Carbonilas), antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e FRAP) e pró-oxidantes (peróxido de hidrogênio e NADPH Oxidase) na musculatura esquelética (gastrocnêmio) e respiratória (diafragma);
- b) mediadores inflamatórios: pela dosagem de interleucinas (IL-6 e IL-10) e TNF- $\alpha$ .

### 3 RESULTADOS

Os resultados da presente dissertação serão apresentados no formato de artigos. O estudo I trata-se de uma revisão sistemática, intitulada **“Respiratory, cardiovascular and musculoskeletal mechanisms involved in pulmonary hypertension pathophysiology: An updated systematic review of preclinical and clinical studies.”** Tendo em vista que o estudo I se encontra submetido ao *Brazilian Journal of Physiotherapy*, o texto segue apresentado na língua inglesa. O estudo II intitulado **“Efeito do treinamento físico combinado sobre os indicadores de estresse oxidativo e inflamação na musculatura esquelética periférica e respiratória em modelo experimental de hipertensão arterial pulmonar”** é apresentado em formato de artigo original a ser traduzido para submissão em periódico internacional.

## 3.1 ESTUDO I

### 3.1.1 INTRODUCTION

Pulmonary hypertension (PH) is a severe, progressive condition with a multifactorial origin<sup>(63)</sup> characterized by increased mean pulmonary artery pressure (PAPm) to  $\geq 20$  mmHg at rest.<sup>(1, 64)</sup> The PH is divided in five groups based on etiology, physiopathology and hemodynamic characterization. Among the main groups, pulmonary arterial hypertension (PAH – Group 1) involves the remodeling of pulmonary arteries and arterioles, inflammation and fibrosis,<sup>(65)</sup> leading to increased pulmonary vascular resistance (PVR) and right ventricle (RV) pressure overload.<sup>(66)</sup> The PAH prevalence varies globally, with rates of 15-50 cases per million in the United States of America and Europe<sup>(67)</sup> and 5.8 per million in Brazil, diagnosed around 46 years of age.<sup>(68)</sup>

Despite advances in PH drug treatments, progressive intolerance to exercise is a hallmark and severely impacts patients' independence and quality of life.<sup>(69)</sup> This underscores the need for scientific investigations on the mechanisms involved in the progression of PH.<sup>(69, 70)</sup> Physical exercise requires the interaction of various physiological mechanisms. Specifically in PH, studies reveal that fatigue and exercise intolerance result not only from central pulmonary impairment but also from cardiovascular and musculoskeletal anomalies, impacting oxygen (O<sub>2</sub>) transport and utilization.<sup>(12, 69, 71-73)</sup> Additionally, afferent pathways like the baroreflex<sup>(74)</sup> and peripheral chemoreflex<sup>(74, 75)</sup> might be involved in PH pathophysiology, correlating with exercise capacity.<sup>(74)</sup>

This study reviews the last decade's literature on PH-related cardiovascular, respiratory, and musculoskeletal alterations involved to its pathophysiology and exercise intolerance. Understanding these mechanisms can identify research gaps and potential therapeutic targets, ultimately enhancing clinical outcomes and patients' quality of life.

### 3.1.2 METHODS

#### *Search methods and selection of articles*

Searches were conducted in the PubMed, SciELO and Cochrane Library databases for original articles published between 2013-2023. The following search terms were employed: 'pulmonary arterial hypertension' or 'pulmonary hypertension' combined with the following terms connected by the Boolean operators AND/OR: 'dysfunction\*', 'muscle dysfunction',

‘cardiovascular dysfunction’, ‘respiratory dysfunction’, ‘fatigue’ and ‘exercise intolerance’ as well as the corresponding terms in Portuguese.

#### *Eligibility criteria*

The construction of the systematic review was guided by the PICO strategy (patient/population, intervention, comparison and outcomes)<sup>(76)</sup> as well as the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA statement).<sup>(77)</sup>

Studies conducted in experimental models or humans, with randomized controlled or non-randomized controlled and non-controlled (pre-post) designs were included. Studies with chronic intervention (e.g., pharmacological treatment specific to PH, physical training), case reports and studies analyzing exclusively ‘quality of life’ or the ‘Six-Minute Walk Test’ were excluded. Articles were selected by two independent assessors. In cases of a divergence opinion between the assessors, a third assessor was consulted.

#### *Data extraction, description and appraisal of methodological quality*

The following data were extracted from each article: 1) author and year of publication, 2) study population, 3) sample and division of groups, 4) study design, 5) protocol description, 6) main variables measured and 7) main outcomes. The SYRCLE *risk of bias* and MINORS tools were used for the appraisal of the methodological quality of studies involving animals<sup>(78)</sup> and humans,<sup>(79)</sup> respectively. Articles were included independently of the scores obtained.

A narrative synthesis was performed to describe and explore the data of the studies. The information was displayed in table 1 and organized by characteristics of the study population, sample size, acute intervention (if applicable) and the main outcomes grouped into respiratory, cardiovascular and musculoskeletal variables.

### **3.1.3 RESULTS**

The searches of the electronic databases led to the retrieval of 512 records. After the analysis of the titles and abstracts, 439 articles were excluded and nine additional records were included through an active search of review articles. Thus, 25 articles that investigated respiratory, cardiovascular and musculoskeletal components associated with the disease progression and exercise intolerance in PH were included in the present systematic review (Flowchart available in Figure 1-).

### *Characteristics of studies*

The characteristics of the studies are detailed in Table 1. Twelve studies were conducted with humans,<sup>(51, 72-75, 80-86)</sup> 11 were preclinical models<sup>(13, 87-96)</sup> and two were conducted in both animals and patients with PH.<sup>(97, 98)</sup> Thirteen studies considered exclusively pre-capillary PH (PAH or chronic thromboembolic pulmonary hypertension – Groups I and IV, respectively). Only Raza et al.<sup>(72)</sup> included patients with suspected post-capillary PH. In the preclinical studies, PAH was induced in all models using monocrotaline (MCT) in different doses (40-600 mg per kg of body weight)<sup>(13, 87, 97)</sup> and frequencies (single dose<sup>(90, 97)</sup> to eight weeks<sup>(13)</sup>) or using the SuHx model [SU5416 (20 mg/kg) and chronic hypoxia (10% FiO<sub>2</sub>)].<sup>(92, 94, 95, 97)</sup>

Interventions in animals comprised the administration of TGF- $\beta$ -activated kinase 1 inhibitor (TAK1i),<sup>(97)</sup> nitric oxide donor in peripheral muscles,<sup>(88)</sup> agonist of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER1)<sup>(89, 90)</sup> and mimic of miRNA ‘miR-126’ in quadriceps.<sup>(98)</sup> In humans, the interventions comprised oxygen supplementation in different doses (21-100% FIO<sub>2</sub>),<sup>(74, 75, 82)</sup> duration (two-five minutes) and conditions (at rest, during an orthostatic challenge, during and after exercise).<sup>(90, 94, 95)</sup>

In humans, aerobic exercise capacity was based on VO<sub>2peak</sub> at cardiopulmonary exercise test (CPET)<sup>(72, 74, 75, 81-83)</sup> or distance walked on the Six-Minute Walk Test (6MWD).<sup>(72, 75, 81, 84, 85)</sup> Resistance exercise capacity was assessed by the maximum voluntary isometric contraction (MVIC) test.<sup>(82, 98)</sup> In the preclinical models, the maximal distance or time until exhaustion on a treadmill or wheel were used.<sup>(89, 90, 96, 98)</sup> All studies confirmed exercise intolerance in both animal models and humans with PH through the reduction in VO<sub>2peak</sub>, 6MWD, time until exhaustion and MVIC. Clinical worsening was assessed directly in one study as progression of the functional class (WHO-FC), risk of lung transplant and mortality.<sup>(84)</sup> Methodological quality is detailed in supplementary material S1 and S2.

### *Main outcomes*

#### *Respiratory and gas exchange mechanisms*

Six studies conducted in humans with PH<sup>(51, 72, 74, 75, 81, 82)</sup> consistently demonstrated a reduced VO<sub>2peak</sub>, increased minute ventilation (V<sub>E</sub>),<sup>(74, 81)</sup> ventilatory inefficiency (increase in the VE/VCO<sub>2slope</sub>),<sup>(78, 94)</sup> reduced O<sub>2</sub> pulse (VO<sub>2</sub>/HR)<sup>(86, 93)</sup> and lower levels of end-tidal O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> (PetO<sub>2</sub> and PetCO<sub>2</sub>, respectively).<sup>(51, 87)</sup> Raza et al.<sup>(72)</sup> used right heart catheterization

combined with gas exchange measures and reported that increased VE/VCO<sub>2</sub> and reduced PetCO<sub>2</sub> measured at rest were positively correlated with the increase in PVR. These authors demonstrated that patients with pre- and post-capillary PH have increased PAPm/cardiac output (CO) and PVR during exercise vs individuals without PAH.

Regarding the studies conducted in animals, pulmonary flow was the main variable of interest (8/13 studies) and was assessed via echocardiogram with regards to the curve pattern,<sup>(89, 90)</sup> pulmonary artery flow acceleration time (PAT) and pulmonary artery velocity time integral (PAVTI).<sup>(73, 82, 87)</sup> The findings of PAH consisted of abnormal pulmonary artery flow pattern (midsystolic notching) and reduced PAT and PAVTI. Reduced PAT was correlated with exercise intolerance.<sup>(89)</sup> Structural changes in pulmonary microcirculation in the MCT-PAH model included increased arteriolar wall thickness<sup>(89, 97)</sup> and deposition of pulmonary interstitial collagen, an indicator of fibrosis.<sup>(89)</sup> Pulmonary endothelial dysfunction was demonstrated by the downregulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS)<sup>(89)</sup> and reduced acetylcholine-dependent vasodilating response which were accompanied by increased alpha-tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) in the lung tissue.<sup>(90)</sup> The selective activation of GPER1 partially corrected the pulmonary arterial flow pattern, hypertrophy and fibrosis of the pulmonary arterioles and increased endothelial function in male and female rats with PAH.<sup>(89, 90)</sup> These benefits were accompanied by an improvement in exercise tolerance.

On the molecular level, Zhamg et al.<sup>(95)</sup> found increased expression of the JMJD1C gene in the pulmonary arterioles of SuHx-PAH model. In contrast, the knockdown of this gene reversed cellular hyperproliferation and apoptosis in the pulmonary vascular smooth muscle cells. Garfield et al.<sup>(97)</sup> found overexpression and differentiation of the growth factor GDF-15 in lung tissue and pulmonary arterioles in SuHx/MCT-PAH models. The GDF-15 mRNA in the pulmonary arterioles of the animals was correlated with RV hypertrophy. In patients with PAH, the serum GDF-15 levels were correlated to poorer exercise capacity.

### *Cardiovascular mechanisms*

Cardiovascular mechanisms were assessed in five studies. Göransson et al.<sup>(86)</sup> found that patients with PAH have impaired resting filling rate in the RV and left ventricle (LV) (indicator of diastolic dysfunction), which, in turn, was correlated with a reduction in systolic volume. In patients with stable PAH, the RV ejection fraction was lower than normal at rest, being an independent predictor of exercise capacity.<sup>(85)</sup> Patients with severe PAH showed low LV contractility, which was accompanied by a reduced cross-sectional area (CSA) of

cardiomyocytes and actin/myosin ratio, as well as increased calcium sensitivity in force generation.<sup>(73)</sup>

Hemodynamic changes in PAH during exercise were reported in two studies.<sup>(72, 80)</sup> Patients with pre-capillary and post-capillary PH exhibited impaired CO during submaximal exercise.<sup>(72)</sup> Spruijt et al.<sup>(80)</sup> reported lower ventricular-arterial coupling and end-systolic elastance ( $\Delta E_{es}$ ) during exercise in pre-capillary PH vs healthy individuals. According to Paula-Ribeiro et al.,<sup>(75)</sup> patients with PAH exhibited impaired vagal indicators during recovery from aerobic exercise [HRR ( $\Delta HR_{peak-30\text{ s}, 60\text{ s}, 120\text{ s}}$  post-exercise) and HR variability (HRV; RMSSD and HF<sub>abs</sub> indices)] vs healthy individuals.

Cardiovascular variables were addressed in 10 animal studies. Increased RV systolic and diastolic pressure was widely reported<sup>(13, 87-91, 94-96)</sup> and correlated with exercise intolerance.<sup>(89)</sup> Indicators of cardiac structural changes were reported as increased RV/LV + septum (cardiac hypertrophy)<sup>(13, 88, 97)</sup> and increased CSA of cardiomyocytes of the RV (ventricular remodeling).<sup>(87)</sup> Two studies conducted by the same group reported increased collagen deposition in the RV.<sup>(89, 90)</sup> The analysis of RV cardiomyocytes demonstrated increased TNF- $\alpha$  and under-expression of the protein sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA2a).<sup>(89, 90)</sup> In these studies, ovariectomized female rats with PAH had accentuated cardiac hypertrophy, fibrosis and the under-expression of SERCA2a in the RV vs. PAH without ovariectomy.<sup>(90)</sup> Conversely, the selective activation of GPER1 in both male and female rats corrected the cardiovascular alterations and increased exercise tolerance in the animals with PAH.<sup>(89, 90)</sup> Zhang et al.<sup>(95)</sup> demonstrated that the inhibition of JMJD1C gene corrected the increase in RV systolic pressure and hypertrophy in these animals to values similar to those found in healthy animals.

### *Musculoskeletal mechanisms*

Musculoskeletal mechanisms were addressed in five studies in humans using peripheral<sup>(51, 81-83)</sup> or respiratory<sup>(81, 85)</sup> muscles. The reduced quadriceps strength and endurance<sup>(51, 81-83)</sup> and reduced respiratory muscle strength<sup>(81)</sup> were reported and correlated with the reduction in exercise capacity.<sup>(81, 82)</sup> Patients with pre-capillary PH showed diaphragm dysfunction by reduced excursion and diaphragm thickening ratio during the 'sniff' maneuver.<sup>(85)</sup> These changes were more accentuated in individuals with lower exercise capacity (6MWD < 377 vs.  $\geq 377$  m)



Two studies demonstrated that individuals with PAH have a lower proportion of type I (oxidative) fibers compared to type II (glycolytic) fibers in the quadriceps muscles(51, 81), whereas one study found no difference in this variable between PAH and healthy individuals.(82) One study found that patients with PAH has reduced capillary density and tissue oxidation in the quadriceps during exercise that is not corrected with O<sub>2</sub> supplementation.(82) Both oxygenation and capillary density were positively correlated with exercise capacity (VO<sub>2peak</sub>) and quadriceps strength.(82) Batt et al.(51) reported that the peripheral muscle atrophy in PAH was accompanied by increased proteolysis mediated by the ubiquitin proteasome system (UPS) and a concurrent depression of networks mediating muscle hypertrophy. These authors also reported a reduction in excitation-contraction coupling via an increase in the phosphorylation of ryanodine receptors.(51) Impairment in O<sub>2</sub> use by peripheral muscles was reported in one study(83) via reduction in oxidative enzymes (pyruvate dehydrogenase), upregulation of glycolytic enzymes (lactate dehydrogenase activity) and abnormal mitochondrial morphology in PAH vs healthy individuals.

Ten studies were conducted with animals and reported atrophy of peripheral<sup>(13, 91, 97)</sup> and respiratory muscles,(13) reduced force generation capacity<sup>(13)</sup> and reduced proportion of oxidative fibers in both the diaphragm and soleus.<sup>(94)</sup> Increased proportion of type II fibers in skeletal muscles in the severe PH was accompanied by the formation of sarcomeric aggregates and increased levels of the transcription factor FoxO1 in the soleus muscles and diaphragm.<sup>(94)</sup> Reduced gastrocnemius CSA was accompanied by increased serum IL-1  $\beta$  and C-reactive protein levels and reduced ATP synthesis.<sup>(91)</sup> In the hypoxia-induced PAH model, one study reported increased levels of TNF $\alpha$  in the diaphragm.<sup>(92)</sup> Four studies have reported that MCT/hypoxia-induced PAH exhibited reduced mitochondrial biogenesis in both peripheral muscles<sup>(91, 93, 94)</sup> and the diaphragm.<sup>(92, 94)</sup>

Two studies addressed musculoskeletal changes during exercise. Long et al.<sup>(96)</sup> reported a reduced blood flow/load and increased plasma lactate during submaximal aerobic exercise (50%VO<sub>2max</sub>) in MCT-induced PAH vs healthy controls. In the study, the increase in blood lactate was negatively correlated with peripheral blood flow. Schulze et al.(88) demonstrated that animals with MCT-PAH exhibited a reduced tissue oxygenation (interstitial PO<sub>2</sub>) in active muscles in the transition from rest to exercise, which was not restored by the administration of the nitric oxide donor (sodium nitroprusside).

Two studies addressed the the musculoskeletal dysfunction via translational protocols.<sup>(97, 98)</sup> Garfield et al.<sup>(97)</sup> reported increased GDF-15 levels in animals and humans with PAH was correlated with reduced strength and diameter of peripheral muscles (rectus femoris

and quadriceps). Moreover, GDF-15 <564 pg/L was a predictor of muscle strength in patients with PAH. In contrast, the reduction in the expression of GDF-15 via TAK1i recovered the diameter of muscle fibers in the tibialis anterior muscle of animals with PAH. Potus et al.<sup>(98)</sup> found that a capillary rarefaction in rats and patients with PAH was accompanied by the under-expression of miR-126 in the quadriceps (angiogenesis factor) and correlated with a poorer exercise capacity. In contrast, the administration of the miR-126 mimic in rats with PAH increased capillary density and exercise tolerance.

#### *Afferent mechanisms involved in respiratory, cardiovascular and musculoskeletal changes*

The peripheral reflexes in PH were assessed in two studies.<sup>(74, 75)</sup> Compared to healthy individuals, patients with PAH had increased resting  $V_E$  response to hypoxia,<sup>(75)</sup> an indicator of peripheral chemoreflex hypersensitivity.<sup>(75)</sup> Conversely, the inhibition of this reflex by the inhalation of 100%  $O_2$  partially corrected the autonomic variables (HRV and HRR) in the recovery from exercise.<sup>(75)</sup> In another study, the authors demonstrated that cardiovascular baroreflex sensitivity (BRS) and effectiveness (BEI) is reduced in individuals with PAH both at rest and during an orthostatic challenge (sit-to-stand test)<sup>(74)</sup> which was correlated with poorer exercise capacity. In contrast, the tonic inhibition of the peripheral chemoreflex by 100%  $O_2$  inhalation increased BRS in both PAH and healthy individuals.

### **3.1.4 DISCUSSION**

The current literature has demonstrated that disease progression and exercise intolerance in PH is not exclusively due to central factors of the respiratory component.<sup>(12, 17, 19, 99)</sup> Findings in the last ten years have advanced the understanding that the pathophysiology of PH involves a combination of respiratory, cardiovascular and musculoskeletal abnormalities.

Notably, the interplay of structural and molecular changes in pulmonary and cardiac microcirculation underlies hemodynamic dysfunction. Specifically, the pulmonary vasculature in PAH has reduced vasodilating capacity<sup>(89, 90)</sup> a systemic inflammatory state<sup>(84)</sup> which contributes to arteriolar vasoconstriction.<sup>(100)</sup> Zang et al.<sup>(95)</sup> demonstrated for the first time that pulmonary and cardiac vascular remodeling in hypoxic PH is partially mediated by the overexpression of the JMJD1C gene, as the inhibition of this gene reversed hyperproliferation and apoptosis in pulmonary artery smooth muscle cells and structural cardiovascular abnormalities. As such changes are correlated with disease severity and injury to the target

organ,<sup>(101)</sup> these findings are especially relevant for patients in Group III (PH associated with lung disease and/or hypoxia), which progresses to a state of chronic hypoxia.

The GDF-15 is a stress-response cytokine expressed in cardiomyocytes, adipocytes, endothelial cells and smooth muscle cells in both normal and pathological conditions.<sup>(102)</sup> This growth factor is associated with cachexia in cases of cardiovascular disease and a set of diseases of an inflammatory nature.<sup>(102)</sup> According to Garfield et al.<sup>(97)</sup>, GDF-15 is overexpressed in the lungs, heart and musculoskeletal tissue in PAH and correlated with the reduction in exercise capacity, which lends strength to the combined contribution of these systems in the PAH pathophysiology. Moreover, the systemic benefits found with the inhibition of GDF-15 via the TAK1 antagonist suggest a potential therapeutic path to be addressed in PH. Importantly, physical activity level in patients with PAH is correlated with lower levels of GDF-15, which suggests the beneficial effect of chronic physical exercise on this pathway.

Two studies conducted by Alencar et al.<sup>(89, 90)</sup> not only demonstrated the contribution of the GPER1 receptor to morphological and molecular changes in PAH, but also point to estrogen as the potential therapeutic target for improving the pathophysiology and exercise intolerance in this population. The authors also investigated the detrimental effect of estrogen suppression in a model mimicking cardiovascular changes mediated by menopause.<sup>(90)</sup> Specifically, ovariectomized female rats with PAH had accentuated heart hypertrophy, fibrosis and changes in the contractile properties of the RV. In contrast, the activation of GPER1 increased exercise tolerance, suggesting the cardioprotective role of estrogen and its depletion as one of the mediators of the exercise intolerance in postmenopausal women with PAH.

The dysfunction of the autonomic nervous system plays a relevant role in the progression of PH.<sup>(99, 103, 104)</sup> Specifically, the increase in cardiovascular sympathetic nervous activity contributes to cardiac overload and peripheral muscle vasoconstriction,<sup>(99)</sup> whereas cardiac vagal impairment is considered an independent predictor of mortality in this population.<sup>(104, 105)</sup> Paula-Ribeiro et al.<sup>(75)</sup> suggested that the reduction in cardiac vagal control persists after the end of physical exercise even in stable patients. As vagal reduction is a predictor of arrhythmogenic events<sup>(106)</sup> and the reduction in HRR in the first minute is a predictor of mortality in this population,<sup>(105)</sup> such findings carry clinical implications.

Evidence gathered by the present systematic review support the involvement of peripheral and respiratory musculoskeletal abnormalities in PH progression and exercise intolerance.<sup>(12, 17)</sup> Functional changes, such as reduced strength and endurance, might be caused by catabolic and inflammatory pathways that contribute to muscle atrophy. In this sense, Batt et al.<sup>(51)</sup> suggests that UPS-mediated proteolysis contributes to skeletal muscle atrophy in these

patients, which itself can limit exercise capacity. The reduction in muscle strength and endurance is also caused by the disordered change in the morphology of sarcomeres<sup>(94)</sup> and the increased proportion of glycolytic muscle fibers,<sup>(51, 81-83)</sup> which are less resistant to fatigue, in the peripheral muscles<sup>(13, 74, 75, 92)</sup> and diaphragm.<sup>(94)</sup>

Abnormalities in macro- and micro-circulation were also correlated with the reduction in exercise capacity.<sup>(96, 98)</sup> Several studies have demonstrated capillary rarefaction,<sup>(82, 96, 98)</sup> which seems to be partially mediated by the downregulation of miR-126.<sup>(98)</sup> This angiogenic factor has therapeutic potential, as the administration of the miR-126 mimic in rats with MCT-induced PAH increased both capillary density and tolerance to exercise.<sup>(98)</sup> The reduction in blood flow to active muscles during physical exercise has also been reported.<sup>(96)</sup> Based on evidence obtained from patients with heart failure<sup>(23)</sup> and PAH,<sup>(107)</sup> it is possible that sympathetic hyperactivation for peripheral muscles contributes to the reduction in blood flow during exercise, limiting exercise capacity in this population.<sup>(108)</sup> Changes in the structure responsible for O<sub>2</sub> use and reduced mitochondrial function was demonstrated in experimental models of PAH, including a reduction in mitochondrial respiration and biogenesis in peripheral<sup>(93)</sup> and diaphragmatic<sup>(92, 94)</sup> muscles.

The studies by Paula-Ribeiro et al.<sup>(74, 75)</sup> suggest that changes in the afferent pathways of baroreceptors and chemoreceptors contribute to cardiovascular and respiratory impairment in PAH. The authors demonstrated for the first time that baroreflex sensitivity and effectiveness are reduced both at rest and during an orthostatic challenge in patients with stable PAH and correlated with worse exercise capacity.<sup>(74)</sup> Cardiovagal baroreflex integrity ensures beat-to-beat hemodynamic control<sup>(109)</sup>, whereas poor functioning of this reflex may contribute to chronotropic incompetence during exercise or orthostatic hypotension.<sup>(110)</sup> Moreover, PAH progresses with an inadequate systolic volume response to physical exercise.<sup>(111)</sup> Thus, HR control via the baroreflex may be one of the adjustment mechanisms of the cardiac output that ensure the adequate supply of O<sub>2</sub> to active muscles. The peripheral chemoreflex is composed of receptors located mainly in the carotid bodies, which are considered the main O<sub>2</sub> sensors of the human body.<sup>(112)</sup> Velez-Roa et al.<sup>(113)</sup> previously demonstrated that sympathetic hyperactivity in PAH may be partially mediated by peripheral chemoreflex hyperactivity. In this sense, Paula-Ribeiro et al.<sup>(75)</sup> demonstrated that patients with PAH have an increased peripheral chemoreflex to hypoxia and adds to the literature that this reflex contributes tonically to cardiac vagal dysfunction and baroreflex dysfunction in PAH.<sup>(74, 75)</sup> These findings suggest the cardiovascular afferent pathways as potential therapeutic targets for improving the pathophysiology of PAH.

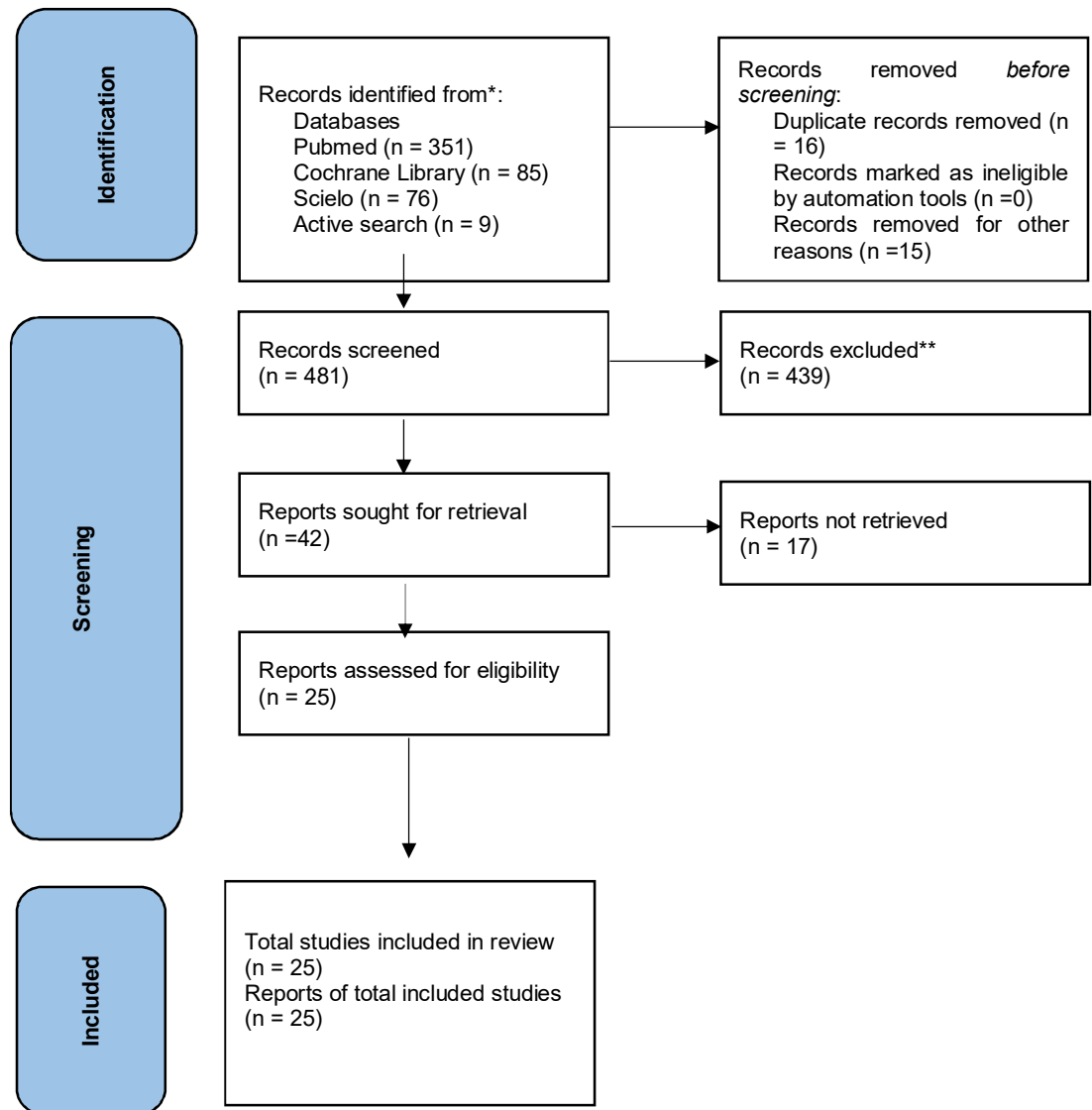
### *Limitations*

A large part of the studies used correlations between the findings and markers of disease severity and exercise tolerance, impeding the establishment of causality among the results. Thus, protocols that directly investigate mechanisms involved in the disease progression are needed. MCT/SuHx are established models for PAH due to the promotion of morphological and hemodynamic changes that mimic those found in humans with PAH. However, other groups of PH, such as those resulting from left heart disease, are not faithfully represented by these models. Moreover, one must take into consideration that there are specific variations in different species and sexes that exert an influence on the progression of the disease and magnitude of the results. Thus, findings obtained in experimental models should be interpreted with caution.

### **3.1.5 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.

**Figure 1.**



**Figure 1.** Flowchart of article selection process.

**Table 1.** Detailed characteristics of the pre-clinical and clinical articles included in the review

Authors	Year	Population	Groups (n/group)	Intervention (if applicable)	Outcomes	Main results
<b>Humans</b>						
Spruijt A. et al	2015	Subjects with pre-capillary PH (CTEPH, PAH)	PH group(n=17) Healthy control group (n=7)	_____	Final systolic elastance at rest and submaximal aerobic exercise ( $\Delta Ees$ ) Ventricle-arterial coupling during exercise (Ees/LV afterload) Pulmonary arterial response to exercise ( $\Delta PAP$ )	$\uparrow \Delta Ees$ : $\uparrow$ in controls, $\leftrightarrow$ in PH Ees/LV afterload: $\leftrightarrow$ in controls, $\downarrow$ in PH PH: $\uparrow \Delta PAP$ correlated to $\uparrow$ HR during exercise
Breda et al.	2014	Subjects with PAH	PAH group (n=16) Healthy control group (n=10)	_____	Quality of life (SF-36) Respiratory muscle strength (PIMax, PEMax) Exercise capacity (6MWD, CPET) Quadriceps cross-sectional area Quadriceps strength Quadriceps morphology	<u>PH vs Control:</u> $\downarrow$ quality of life, $\downarrow$ PIMax and PEMax, $\downarrow$ exercise capacity ( $\downarrow$ 6MWD and $VO_2$ ), $\downarrow SpO_2$ , $\downarrow$ Max Workload, $\uparrow VE/VCO_2$ , $\uparrow FC$ , $\downarrow O_2$ pulse, $\downarrow PetO_2$ e $\downarrow PetCO_2$ $\downarrow$ % lean and fat mass, $\leftrightarrow$ Quadriceps cross-sectional area $\downarrow$ Quadriceps strength $\downarrow$ type I e IIa fibers (PH vs reference values*) Correlations: $\uparrow VO_2$ - $\uparrow$ Quadriceps strength and $\uparrow$ PIMax
Malenfant et al	2015	Subjects with PAH	PAH group (n=10) Healthy control group (n=10)	$O_2$ supplementation (21%) during submaximal exercise	Cardiovascular response to CPET Volitional and non-volitional quadriceps strength Quadriceps morphology Quadriceps capillary and tissue oxygenation (21% and 100%)	<u>PH vs Control:</u> $\downarrow$ exercise capacity (Max workload, $VO_2$ , $\uparrow VE/VCO_2$ ) $\downarrow$ Quadriceps strength, $\leftrightarrow$ type I e IIa fibers, $\downarrow$ capillary density, $\downarrow$ tissue oxygenation <u>Normoxia vs Hyperoxia:</u> $\leftrightarrow$ tissue oxygenation <u>Correlations:</u> $\uparrow$ capillary density - $\uparrow VO_2$ and tissue oxygenation $\uparrow$ tissue oxygenation - $\uparrow$ quadriceps strength and $VO_2$
Malenfant et al	2015	Subjects with PAH	PAH group (n=8) Healthy control group (n=8)	_____	Cardiovascular response to CPET (CPET and quadriceps strength and endurance) Proteomic profile and mitochondrial morphology of peripheral skeletal muscle (lateral vastus)	<u>PH vs Control:</u> $\downarrow$ exercise capacity $\downarrow$ Regulation of proteins related to mitochondrial function and structure in peripheral muscles, decreased oxidative enzymes.

↑ regulation of proteins (glycolytic enzymes) in peripheral muscles.  
Abnormality in mitochondrial morphology.

Paula-Ribeiro	2019	Subjects with PAH	PAH group (n=20) Healthy control group (n=13)	O <sub>2</sub> supplementation (100%) during post-exercise recovery (5 min)	Exercise capacity (CPET) Post-exercise autonomic control via heart rate recovery (HRR) and HR variability (HRV) Peripheral chemoreflex sensitivity index (ventilatory response to hypoxia)	<p><u>PH vs Controls:</u></p> <p>↓ exercise capacity (↓ TC6M e VO<sub>2</sub>), ↓ SpO<sub>2</sub>, ↓ Max Workload, ↑ VE/VCO<sub>2</sub>, ↑ HR, ↓ O<sub>2</sub> pulse, ↓ PetO<sub>2</sub> and ↓ PetCO<sub>2</sub> ↓ cardiac vagal control (↓ HRR and HRV) ↑ chemoreflex sensitivity (VE response to hypoxia)</p> <p><u>PAH in hyperoxia vs normoxia:</u></p> <p>↑ HRV and HRR</p> <p><u>Correlation</u></p> <p>↑ chemoreflex sensitivity to hypoxia - ↓ vagal control (HRR)</p>
Paula-Ribeiro	2021	Subjects with PAH	PAH group (n=19) Healthy control group (n=13)	O <sub>2</sub> supplementation (100%) at rest and during orthostatic stress (sit-to-stand test, 2 min)	Exercise capacity (CPET) Cardiovascular baroreflex sensitivity (BRS) and effectiveness (BEI)	<p><u>PH vs Controls:</u></p> <p>↓ Cardiovascular baroreflex control at rest and during orthostatic stress</p> <p><u>PAH and control in hyperoxia vs normoxia:</u></p> <p>↑ BRS and BEI at rest and during orthostatic stress</p> <p><u>Correlation</u></p> <p>↑ BEI - ↑ exercise capacity (VO<sub>2peak</sub>)</p>
Al-Naamani et al.	2016	Subjects with PAH	Single group (n=65)	_____	<p>Inflammation biomarkers: N-terminal pro-brain natriuretic peptide fragment (NT-pro-BNP), Von Willebrand factor (vWF), Soluble P-selectin, C-reactive protein, tumor necrosis factor alpha (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), beta-thromboglobulin, thromboxane B<sub>2</sub>.</p> <p>Total and HDL cholesterol, triglycerides Functional class (WHO-FC) Exercise capacity (6MWD)</p>	<p>Inflammation biomarker (↑ FvW, ↓ HDL, ↑ thromboxane B<sub>2</sub>) were associated to clinical worsening (↑ WHO-FC) and reduced exercise capacity (↓ 6MWD).</p> <p><u>Correlations:</u> ↑ NT-pro-BNP, ↓ FvW - ↑ lung transplant and mortality risks</p>



Survival

Batt et al	2014	Subjects with PAH	PAH group (n=12) Healthy control group (n=10)	_____	Quality of life (SF-36) Cardiovascular response to CPET( $VO_2$ , $VE/VCO_2$ ) Quadriceps cross-sectional area Morphology and morphometry of lateral vastus muscle	<u>PH vs Controls:</u> ↓ Quality of life ↓ Exercise capacity( $\downarrow VO_2$ , $\uparrow VE/VCO_2$ ) ↓ Quadriceps cross-sectional area $\uparrow$ type II fibers. $\downarrow$ type I/type II ratio lateral vastus: $\downarrow$ AKT fosforilation and p70S6 kinase ( $\uparrow$ proteolysis); $\uparrow$ phosphorylation of ryanodine receptors ( $\downarrow$ excitation-contraction coupling)
Spiesshoefer et al	2019	Subjects with pre-capillary PH (CTEPH, PAH)	PAH group (n=43) Healthy control group (n=43)	_____	Diaphragm function (excursion and thickening) NT-proBNP e capillary $CO_2$ ( $PaCO_2$ ) Pulmonary function (spirometry) PAPs (echo) e RVEF (magnetic resonance) Exercise capacity (6MWD)	<u>PH vs Controls:</u> $\downarrow$ excursion and thickening, $\uparrow$ NT-pro-BNP, $\downarrow$ $PaCO_2$ $\downarrow$ RVEF $\downarrow$ Exercise capacity(6MWD) <u>Exercise capacity predictors:</u> NT-pro-BNP and RVEF
Manders et al.	2014	Subjects with PAH	PAH group (n=14) Healthy control group (n=15)	_____	Left Ventricle (LV) function LV cross-sectional area and force-generating capacity	<u>PH vs Controls:</u> $\downarrow$ LV cross-sectional area and force-generating capacity $\downarrow$ number of cross-bridges, $\downarrow$ actin/myosin ratio ( $\downarrow$ contractile capacity of LV). $\downarrow$ phosphorylation of sarcomeric proteins and $\uparrow$ calcium sensitivity in force generation.
Raza et al	2022	Subjects with pre- or post-capillary PH	Pre-capillary PH (vascular disease, n = 14) Post-capillary PH (n = 33) Absence of PH via right heart catheterism (n = 8)	_____	Pulmonary and cardiac hemodynamics at rest and during exercise (echo and/or right heart catheterization), Exercise capacity and gas exchange (at rest and during exercise) 6MWD NT-pro-BNP	<u>Pre-capillary PH vs other groups:</u> $\uparrow$ comorbidities, $\downarrow$ 6MWD, $\uparrow$ NT-pro-BNP <u>Pre and Post- capillary PH vs Controls:</u> $\downarrow$ CO, $\uparrow$ slope PAPm/ $CO_2$ , $\uparrow$ PVR to exercise $\uparrow$ $VE/VCO_2$ e $\downarrow$ $PetCO_2$ at rest and exercise <u>Correlations:</u> $\uparrow$ $VE/VCO_2$ and $\downarrow$ $PetCO_2$ no reposo - $\uparrow$ PVR

Göransso et al	2018	Subjects with PAH	PAH group (n=10) Healthy control group (n=10)	_____	Cardiac function: emptying rate and diastolic filling rate of RV and LV and stroke volume (SV)	<u>PAH vs Controls:</u> ↓ RV and LV filling rate <u>Correlations:</u> RV and LV diastolic function - ↓ SV
<b>Animal model or mixed (animal + humans*)</b>						
Pacagnelli et al.	2016	Wistar rats- PAH via MCT (60 mg/kg)	PAH group -MCT (n=8) Control group (n=8)	_____	Pulmonary and cardiac vascular function: Pulmonary acceleration time (PAT), maximum velocity of the pulmonary artery (PVMax), and right ventricular ejection time (RVET). Cardiac structure: Fractal dimension of cardiomyocytes.	↑ PAPm, ↓ PAT, PVMáx, RVET ↑ RV cross sectional area
Garfield et al *	2019	<i>Sprague-Dawley</i> rats- PAH via MCT (40 mg/Kg) Mice SU5416 (20mg/kg) chronic hypoxia (10% FiO <sub>2</sub> )= SuHx Subjects with PAH	Observational: MCT (n=16) Saline control (n = 14) Subjects with PAH (n=30) Intervention study: Group MCT (n =10) Control group (n=10) MCT + TAK1i (n = 10) Sugen/hypoxia (n = 5) Group hypoxia (n=5) Control group +normoxia (n=5)	Intraperitoneal administration in MCT rats: TGF-β-activated kinase 1 inhibitor (TAK1i)	In all groups: Diameter and strength of the anterior tibial muscle, Biomarker for muscle loss (GDF-15)  Animals with MCT: Lung smooth muscle actin and GDF-15 expression  <i>In vitro:</i> GDF-15 and NFκB phosphorylation in myotubes  Subjects with PAH: Cross-sectional area of the rectus femoris muscle Maximum voluntary contraction of quadriceps Level of physical activity Exercise capacity (6MWD) Serum NT-pro-BNP	<u>PAH (MCT/sugen-hipoxia) vs Controls:</u> Tibial muscle atrophy ↑ Pulmonary mRNA GDF-15 expression. ↑ GDF-15 levels in pulmonary arterioles  <u>MCT + TAK1i vs MCT:</u> ↓ GDF-15 and NFκB ↑ tibial muscle diameter  <u>Correlations:</u> PAH-MCT: GDF-15 - ↓ weight and diameter of anterior tibial fibers (atrophy). ↑GDF-15 -↑ cardiac hypertrophy (RV/LV+S)  Subjects with PAH: ↑GDF-15 - ↓6-minute walk distance, ↑ NT-pro-BNP, ↓ TAPSE (tricuspid annular plane systolic excursion), ↓ strength,

						<p>↓diameter of peripheral muscles (rectus femoris and quadriceps).</p> <p>↑ physical activity - ↓level GDF-15.</p> <p>GDF-15 levels &lt; 564 pg/L - predictor of muscular strength</p>
Schulze et al	2021	<i>Sprague-Dawley</i> rats- PAH via MCT (50 mg/kg)	PAH group -MCT (n=11) Control group (n=10)	Administration of sodium nitroprusside (nitric oxide donor, 300 μM) during contraction of the trapezius muscle (1 Hz, 6 V, 180 seconds of contraction)	Tissue oxygenation in the trapezius muscle (interstitial PO <sub>2</sub> ) and partial pressure of O <sub>2</sub> in arterial blood (PaO <sub>2</sub> )	<p><u>PAH vs Controls:</u></p> <p>↑ cardiac hypertrophy (↑ right ventricle/left ventricle + septum), pulmonary congestion, ↑RVSP, ↓PaO<sub>2</sub> (arterial hypoxemia), ↓ PO<sub>2</sub> in trapezius muscle during transition to contraction (↓ tissue oxygenation).</p> <p>Nitric oxide did not restore tissue PO<sub>2</sub> during contraction</p>
Alencar et al	2017	Rats <i>Wistar</i> – PAH via MCT (60 mg/Kg)	MCT + vehicle (n=5 ) MCT + G1 (n=5) Healthy control group (n=5)	Group MCT + G1= administration of 400 μg/kg/day of G protein-coupled estrogen receptor (GPER1) for 2 weeks	<p>Cardiac function and structure (Pulmonary Systolic Ventricular Dysfunction and RV hypertrophy)</p> <p>Hemodynamic and pulmonary arteriolar remodelling.</p> <p>Collagen content in pulmonary arterioles.</p> <p>Biomarkers in heart and lung (TNF-α and eNOS)</p> <p>SERCA2a content in the RV.</p> <p>Interstitial cardiac collagen content (fibrosis)</p> <p>Exercise capacity (on a treadmill).</p>	<p><u>PAH vs Controls:</u></p> <p>Cardiac dysfunction, cardiac and pulmonary remodelling: ↓ SERCA2a, TNF-α, ↓ exercise tolerance, ↑ cardiac collagen and pulmonary interstitium, ↑ pulmonary arteriolar thickness, ↓ pulmonary eNOS</p> <p><u>Group MCT + G1 vs vehicle:</u></p> <p>Activation of GPER = ↓ right ventricular and pulmonary hypertrophy, ↑ left ventricular cardiac output, ↓ changes in pulmonary artery flow, ↑ SERCA2a and ↓ TNF-α, ↓ fibrosis in heart and pulmonary arterioles, ↓ pulmonary fibrosis and ↑ eNOS, ↑ exercise tolerance (time to exhaustion)</p> <p><u>Correlations:</u></p> <p>Exercise intolerance - ↓ LVCO, ↓ pulmonary artery flow, ↑ RVSP. ↓ SERCA2a - ↑ TNF-α.</p>

Allencar et al	2018	Female rats <i>Wistar</i> - PAH via MCT (60 mg/Kg)	bilateral ovariectomized Groups (OVX n = 18 each) Control healthy MCT +G1 MCT + vehicle Groups SHAM (n = 15 each) Control healthy MCT + vehicle	Group MCT + G1= administration of 400 µg/kg/day of G protein-coupled estrogen receptor (GPER1) for 2 weeks	Pulmonary and cardiac function and structure (Pulmonary Systolic Ventricular Dysfunction and RV hypertrophy) Pulmonary endothelial function (vasodilation response to acetylcholine) SERCA2a content in RV Exercise capacity (on a treadmill). Interstitial cardiac collagen content (fibrosis) Fatigue and contractile function of soleus muscle	<u>Groups PAH (OVX OR sham) vs Controls:</u> Cardiac dysfunction, cardiac, and pulmonary remodelling: ↓ pulmonary endothelial vasodilation, ↓ exercise tolerance, ↓ SERCA2a in the RV, ↓ peak force in soleus muscle  <u>Groups PAH OVX vs sham:</u> ↑ cardiac hypertrophy, ↑ cardiac collagen, ↓ exercise tolerance. Activation of GPER = ↓ hypertrophy, ↑ exercise tolerance, ↑ peak force, ↑ SERCA2a in RV.
Moreira-Gonçalves et al	2015	<i>Wistar</i> rats - PAH via MCT (60 mg/kg)	Control group (n=10) MCT group (n=15)	_____	Body weight. Hemodynamic function of the RV Serum albumin, total protein, LDL and HDL cholesterol, triglycerides. Serum inflammatory biomarkers (IL-1 β, C-reactive protein). Gastrocnemius muscle - catabolic factors, cross-sectional area, mitochondrial ATP synthase.	<u>PAH vs Controls</u> RV dysfunction = ↑ RVSP and final diastolic pressure, ↓ body weight, mass, and cross-sectional area of gastrocnemius muscle, ↑ serum biomarkers of inflammation and peripheral muscle catabolism, ↓ ATP synthesis in peripheral muscles.
Potus et al *	2014	<i>Sprague Dawley</i> rats - PAH via MCT (60 mg/kg) Subjects with PAH	Healthy control rats (n=12) MCT- rats (n=12) PAH group (n= 20) Control healthy subjects (n=20)	Administration of miR-126 mimic in a subset of healthy animals and MCT (2 µg/quadriceps), every 4 days, for 2 weeks.	Aerobic exercise capacity (CPET) and resistance exercise endurance of quadriceps. Microcirculation of quadriceps. Quadriceps muscle - angiogenesis (miR-126) and vascular endothelial growth factor (VEGF) Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK).	<u>PAH (Humans and MCT) vs Controls</u> ↓ exercise tolerance ↓ microcirculation in peripheral muscles (↓ capillary density). ↓ expression of miR-126 ↔ VEGF e VEGF 2 <u>In Rats with MCT:</u> Mimic of miR-126 ↑ quadriceps capillary density and exercise tolerance <u>Correlations:</u> In humans - ↑ exercise capacity (VO <sub>2peak</sub> ) - ↑ miR-126
Cannon et al	2022	Mice- PAH via SU5416 (20mg/kg) chronic SuHx	Groups ST2-/- Vehicle SuHx	_____	Diaphragm muscle - mitochondrial respiration, inflammatory markers, and contractile function	<u>Animais com PAH (SuHx) vs Controls:</u> ↑ Diaphragm TNFα ↔ NFκB

		hypoxia (10% FiO <sub>2</sub> ) = SuHx Subjects with PAH	Control groups (WT) Vehicle SuHx n = 21 por group		↓Force generating capacity Diaphragm muscle - mitochondrial dysfunction
Ahn et al.	2013	Mice C57BL6 – PAH via MCT (600 mg/weight – 6-8 weeks)	MCT (n=5-9) Saline control group (n=10-16)	RV and LF morphometry. Body weight, soleus muscle weight, contractile properties of diaphragm muscle	<u>Animais com PAH vs Controlss:</u> ↑ VD/VE + septum ↓ Body weight, soleus muscle weight diaphragm muscle: ↓ cross sectional area, ↓tetanic isometric and isotonic force
Enache et al.	2013	<i>Wistar</i> rats- PH via MCT (60 mg/kg)	Saline control group (n=11) MCT (n=15)	RV and LV cardiac function Biogenesis and mitochondrial respiration of the gastrocnemius muscle	Before RV failure: ↓ biogenesis in RV and gastrocnemius After failure: ↓mitochondrial respiration in RV and gastrocnemius
Kosmas et al	2022	<i>Sprague-Dawley</i> rats- PAH via SU5416 (20mg/kg) chronic hypoxia (10% FiO <sub>2</sub> ) = SuHx	Group SuHx (n=9) Healthy control group (n=9)	RV and LF function and morphometry. Aerobic exercise capacity (time to exhaustion). % type I and type II fibers in soleus, extensor hallucis longus, and diaphragm muscles. Mitochondrial biogenesis in peripheral muscles and diaphragm..	<u>Animais com PAH vs Controlss:</u> ↑RVSP, VD/VE + septum, ↔LVSP ↓ exercise tolerance ↑ FoxO1 in soleus and diaphragm (tendency) ↑% type II (glycolytic) / type I (oxidative) ↑aggregates in the sarcomers of the soleus muscle ↓mitochondrial biogenesis in the soleus and diaphragm muscles.
Long et al.	2022	Rats <i>Sprague Dawley</i> - PAH via MCT (60 mg/kg)	Saline control group (n=16) MCT (n=23)	Blood flow in peripheral muscles during submaximal exercise (50% of VO <sub>2</sub> max). Capillarization of soleus muscle and extensor hallucis longus (EHL) muscle. RV and LF function and structure	<u>Animais com PAH vs Controlss:</u> ↑ cardiac hypertrophy, ↑RVSP, ↓ exercise capacity (↓VO <sub>2</sub> ). Response to submaximal exercise: ↓ Blood flow/load, ↑ plasma lactate. ↔ Capillarization of soleus and extensor hallucis longus muscles. <u>Correlation:</u>

↑ plasma lactate - ↓ Skeletal muscle blood flow.

Zhang et al.	2023	Mice C57BL - PAH por Chronic hypoxia (10% FiO <sub>2</sub> )	Control group - normoxia (n=6) Hypoxia group (n=6)	RV and LF function and morphometry Thickness of pulmonary arterioles. Regulation of the JMJD1C gene in lung tissue. Serum lactate levels in the lung.	<u>PAH (hypoxia) vs Controls (normoxia):</u> ↑RVSP, cardiac hypertrophy (↑ RV/LV + septum), ↑ remodeling of pulmonary arterioles. ↑ gene expression of JMJD1C. Knockdown of JMJD1C reverses cardiovascular and pulmonary alterations caused by hypoxia, ↓ serum levels of pulmonary lactate in animals with PAH
--------------	------	--	--	--	---

---

PH, pulmonary hypertension; PAH, pulmonary arterial hypertension; MCT, monocrotaline; PIMax and PEMax, maximal inspiratory and expiratory pressure; CPET, cardiopulmonary exercise test; 6MWD, six minute walking distance; TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion; SERCA2a, sarco(endo)plasmic Reticulum Calcium ATPase 2a,

## SUPPLEMENT DATA

**Table S1.** SYRCLE’s RoB tool for each experimental animal studies.

	Random Sequence Generation	Baseline Characteristics	Allocation Concealment	Random Housing	Blinding (study Team)	Random Outcome Assessment	Blinding (Outcome Assessors)	Incomplete Outcome Data	Selective Outcome Reporting	Other sources of bias
	SELECTION BIAS			PERFORMANCE BIAS		DETECTION BIAS		ATTRITION BIAS	REPORTING BIAS	OTHER
Pacagnelli et al. 2016	?	+	-	+	-	-	-	?	+	?
Garfield et al. 2019*	?	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Schulze et al. 2021	?	+	-	?	-	-	-	-	+	+
Alencar et al. 2017	?	+	-	?	?	-	?	+	+	+
Alencar et al. 2018	?	+	-	?	?	-	?	?	+	+
Moreira-Gonçalves et al. 2015	?	+	-	?	?	-	?	?	+	+
Potus et al. 2014*	?	+	-	?	+	+	?	?	+	?

Cannon et al. 2022	?	+	+	+	?	-	?	+	+	+
Ahn et al. 2013	?	+	-	?	?	-	?	?	+	?
Enache et al. 2013	?	+	-	?	?	-	?	-	+	+
Kosmas et al. 2022	?	+	-	?	?	-	?	+	+	+
Long et al. 2022	+	+	-	?	-	-	-	+	+	+
Zhang et al. 2023	?	+	+	+	?	-	-	+	+	+

+: low risk of bias - : high risk of bias ?: unclear risk of bias . \*: articles conducted in animals and humans.



**Table S2.** MINORS, methodological index for non-randomized studies

	Year	A clearly stated aim	Inclusion of consecutive patients	Prospective collection of data	Endpoints appropriate to the aim of the study	Unbiased assessment of the study endpoint	Follow-up period appropriate to the aim of the study	Loss to follow-up <5	Prospective calculation of the study size	Adequate control group	Contemporary groups	Baseline equivalence of groups	Adequate statistical analyses	Total
Spruijt. et al	2015	2	2	2	2	0	1	0	1	2	0	1	2	15
Breda et al.	2014	2	2	2	0	0	1	0	1	2	0	1	2	13
Malenfant et al.	2015	2	2	2	2	0	0	0	2	2	0	2	2	16
Malenfant et al.	2015	2	2	2	0	0	0	0	2	2	1	2	2	15
Paula-Ribeiro et al.	2019	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	22
Paula-Ribeiro et al.	2021	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	22
Al-Naamani et al.	2016	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	22
Batt et al.	2014	2	0	1	0	0	2	0	1	2	0	2	2	12
Spiesshoefer et al.	2019	2	1	1	1	0	1	0	1	2	0	2	2	13
Manders et al.	2014	2	1	2	0	0	1	0	1	2	0	2	2	13
Raza et al.	2022	2	2	2	0	0	1	0	1	2	0	2	2	14

Göranso et al.	2018	2	2	2	0	0	1	0	1	2	0	2	2	14
----------------	------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

The items are scored 0 (not reported), 1 (reported but inadequate), or 2 (reported and adequate).

The maximal score is 16 for non-comparative studies and 24 for comparative studies.

## 3.2 ESTUDO II

### 3.2.1 INTRODUÇÃO

A Hipertensão arterial pulmonar (HAP) é um subtipo de hipertensão pulmonar (HP) pré-capilar, caracterizada por remodelamento arterial pulmonar<sup>(1)</sup>, e é definida pelas seguintes medidas por cateterismo direito: pressão arterial pulmonar média (PAPm)  $\geq 20$  mmHg em repouso, pressão de oclusão da artéria pulmonar (PoAp) menor ou igual 15 mmHg e resistência vascular pulmonar (RVP) superior a 3 unidades Wood<sup>(1, 2)</sup>.

A prevalência de HAP é de aproximadamente 10,6 casos por 1 milhão de adultos nos EUA. Se não for tratada, a HAP progride para insuficiência cardíaca direita e morte<sup>(5)</sup>. Com a progressão da doença, indivíduos com HAP demonstram caquexia, fraqueza da musculatura periférica e inspiratória e progressiva intolerância ao exercício físico; sintomas esses associados à piora clínica e redução significativa na qualidade de vida<sup>(10)</sup>.

Alterações no perfil inflamatório e de estresse oxidativo podem estar envolvidos na fisiopatologia e progressão da HAP. Nesse sentido, é sabido que o estresse oxidativo – caracterizado pelo desbalanço entre mediadores pró-oxidantes e antioxidantes – na vasculatura pulmonar pode mediar o aumento da RVP e PAPm via remodelamento arteriolar pulmonar na HAP<sup>(11)</sup>. Adicionalmente, um corpo recente de evidências tem demonstrado que o estresse oxidativo na musculatura esquelética periférica e respiratória participam de maneira importante da progressão dessa doença<sup>(12-15)</sup>.

Moreira-Gonçalves et al<sup>(15)</sup> demonstraram que o aumento do estresse oxidativo e perfil inflamatório pode ser um dos mediadores da caquexia e atrofia muscular periférica no modelo experimental de HAP. Ainda, a fraqueza da musculatura inspiratória – alteração bem estabelecida em pacientes com HAP – parece ser parcialmente mediada pelo aumento de citocinas inflamatórias (tais como TNF- $\alpha$  e IL-1) que promovem a degradação dos filamentos de actina e disfunção contrátil do diafragma<sup>(12, 13)</sup>. Por fim, tendo o conhecimento de que o aumento do estresse oxidativo e inflamação podem mediar a atrofia muscular periférica e respiratória, tal alteração parece também contribuir para a redução da capacidade de exercício nessa população<sup>(16, 17)</sup>.

Por outro lado, o treinamento físico é considerado um tratamento adjuvante para melhora dos parâmetros clínicos em pacientes com HAP<sup>(18)</sup>. Dentre os benefícios observados pelo treinamento físico estão a diminuição da PAPm e aumento do débito cardíaco. Tal redução da PAPm sugere uma diminuição do tônus vascular pulmonar, caracterizando um possível remodelamento nos vasos pulmonares<sup>(19)</sup>.

Os exercícios aeróbios são caracterizados por envolver grandes grupos musculares, sendo os principais responsáveis pela melhora do consumo máximo de oxigênio (VO<sub>2</sub>máx) e pelos ajustes autonômicos envolvidos no controle da pressão arterial e da frequência cardíaca<sup>(114)</sup>. Já os exercícios resistidos resultam em hipertrofia muscular com aumento de força, ganho de resistência e potência muscular <sup>(114, 115)</sup>. A prática de exercícios envolvendo o treinamento aeróbio associado ao treinamento resistido, em uma mesma sessão ou em um microciclo de treinamento, é denominada de treinamento físico combinado. Esse tipo de treinamento tem sido aplicado tanto no âmbito do treinamento esportivo quanto na reabilitação cardiorrespiratória nos últimos anos, por associar os benefícios relacionados à melhora da capacidade cardiorrespiratória e as adaptações positivas obtidas com o ganho de força.<sup>(116)</sup>

Especificamente em pacientes com HAP, ensaios clínicos 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, qualidade de vida e, por consequência, na sobrevivência desses pacientes <sup>(21, 22)</sup>. Dentre os protocolos de TF recomendados em diferentes *Guidelines* para Reabilitação Cardíaca e Pulmonar <sup>(23, 24)</sup> seguros e eficazes para HAP estável <sup>(25)</sup> e demais doenças cardiorrespiratórias <sup>(26, 27)</sup>, destacam-se os protocolos que incluem TF combinado (i.e, a associação do aeróbio com o resistido).

No entanto, permanece desconhecido o papel do TF combinado sobre os marcadores de estresse oxidativo e inflamação na musculatura periférica e respiratória no modelo experimental de HAP.

### **3.2.1 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **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; N° 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. Destacamos que a utilização desses tecidos previamente coletados está alinhada com o princípio 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.

### **Amostra e desenho experimental:**

A fase *in vivo* do estudo consistiu em induzir a HAP por MCT e submeter os animais ao TF combinado, de moderada intensidade, por 4 semanas. 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 ratos foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos (6-8 ratos/grupos): Ratos submetidos à injeção de MCT sedentários (**MCT-SED**); Ratos submetidos à injeção de MCT treinados (**MCT-TF**), Ratos controles submetidos à injeção de salina sedentários (**SAL-SED**) e Ratos controles submetidos à injeção de salina treinados (**SAL-TF**).

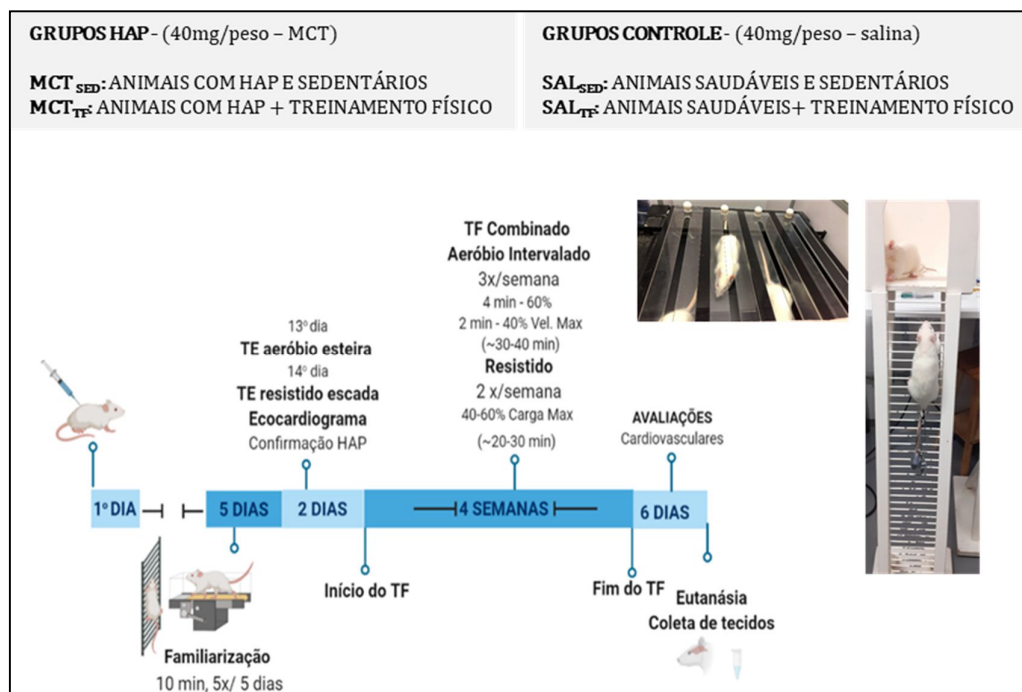
### **3.2.3 PROTOCOLO**

A indução da HAP foi obtida pela injeção subcutânea de 40 mg/kg de peso corporal de MCT (Sigma-Aldrich) em dose única <sup>(117)</sup>. Animais controle receberam a mesma dose acima de solução salina. O estabelecimento da HAP foi confirmado após 2 semanas da administração de MCT via parâmetros ecocardiográficos indicadores do aumento da RVP e da pressão arterial pulmonar (PAPm), sendo estes: redução do tempo de aceleração do fluxo artéria pulmonar (TAc), redução da relação TAc/tempo de ejeção do ventrículo direito (TAc/TE), aumento da relação Diâmetro da artéria pulmonar/diâmetro da aorta, aumento da PAPm [estimada via fórmula  $58,7 - (1,21 \times TAc)$  <sup>(117, 118)</sup>, aumento da relação diâmetro da artéria pulmonar/diâmetro da aorta (DP/DA).

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 <sup>(117)</sup> 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-TF 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 e um novo ecocardiograma. Ao

término dos experimentos funcionais (no 6º dia após o término do TF), os animais foram eutanasiados e sangue/técidos foram coletados (Figura 1).



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

### 3.2.4 AVALIAÇÕES

#### Procedimentos experimental

##### Teste de tolerância ao esforço máximo

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<sup>(119)</sup>. 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<sup>(120)</sup>.

##### Treinamento físico

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 <sup>(21)</sup> quanto em modelos experimentais de HAP <sup>(117)</sup>. O protocolo aeróbio alternou 4 minutos a 60% da velocidade máxima de corrida e 2 minutos a 40%, com duração de ~30-40 min <sup>(121)</sup>. 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) <sup>(120)</sup>.

### **Eutanásia dos animais**

Ao término dos experimentos, os animais foram eutanasiados por decapitação após anestesia prévia e os tecidos musculares foram imediatamente retirados, pesados e armazenados (-80°C) para preservação.

### **Avaliações de Mediadores Inflamatórios**

Dosagens de interleucinas (IL-6 e IL-10) e TNF- $\alpha$  na musculatura periférica e diafragmática (homogeneizado) foram determinadas via kits específicos (ELISA) (R&D Systems Inc.) para ratos, conforme previamente descrito <sup>(104, 122)</sup>.

### **Avaliações de Estresse Oxidativo**

As técnicas para determinação do perfil de estresse oxidativo foram previamente descritas em detalhes <sup>(122, 123)</sup>. A dosagem de proteína foi quantificação pelo método descrito por Lowry et al. <sup>(124)</sup>.

O ensaio antioxidante de determinação do poder de redução do íon ferro (FRAP) foi realizado em microplaca, adicionando-se 290 $\mu$ L o de FRAP (buffer acetato de sódio e ácido acético, pH 3,6; TPTZ 10mM; cloreto férrico hexahidratado 20mM) 10  $\mu$ l de uma solução-padrão de sulfato ferroso heptahidratado ou 10  $\mu$ L de musculo gastrocnêmio e diafragma. A microplaca foi então incubada durante 5 minutos com agitação à 37°C. Os resultados são expressos em  $\mu$ moles/mg/proteína <sup>(125)</sup>.

A quantificação da atividade da SOD baseou-se na inibição da reação entre  $O_2^{\cdot -}$  e pirogalol <sup>(126)</sup>. A atividade de CAT foi determinada medindo a diminuição da absorbância de  $H_2O_2$  a 240 nm <sup>(127)</sup>.

A concentração de peróxido de hidrogênio foi avaliada com base na oxidação do vermelho de fenol mediada pela peroxidase de rábano silvestre (HRPO) pelo  $H_2O_2$  <sup>(128)</sup>.

A atividade da NADPH oxidase foi determinada em homogeneizado de músculos periféricos e diafragmático e avaliada pela produção de superóxido (ELISA) <sup>(129)</sup>.

A peroxidação lipídica foi avaliada por substâncias reativas ao tiobarbitúrico (TBARS). Os resultados são expressos como nmol/mg de proteína, adaptação de Ohkawa (1979)<sup>(130)</sup>. A determinação da oxidação proteica foi determinada pela técnica das carbonilas<sup>(123)</sup>.

### **3.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados referentes à confirmação do estabelecimento da HAP pelo modelo de MCT, às cargas máximas obtidas por cada grupo e utilizadas na prescrição do TF e aos marcadores de estresse oxidativo e mediadores inflamatórios nos músculos gastrocnêmio e diafragma. Os dados são apresentados em média e desvio padrão. Os pressupostos de normalidade e homogeneidade dos dados foram testados por meio dos testes Shapiro–Wilk e Levene e os grupos foram comparados por análise de variância de duas vias (Anova two-way) seguidos por post-hoc de Tukey. Para todos os testes foi adotado o nível de significância de 5%.

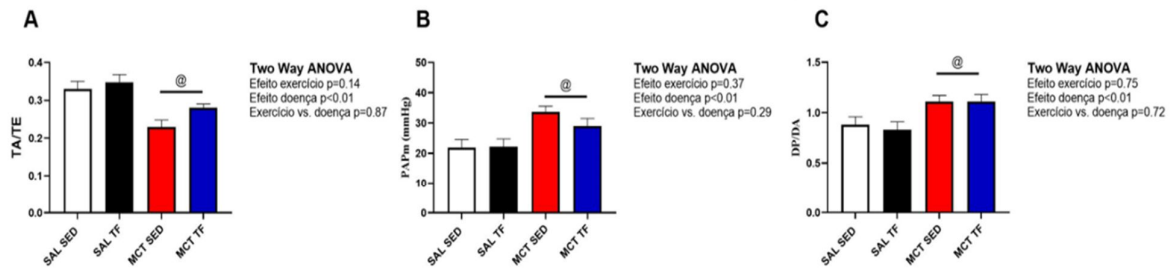
### **3.2.6 RESULTADOS**

#### **Indicadores do estabelecimento de hipertensão arterial pulmonar**

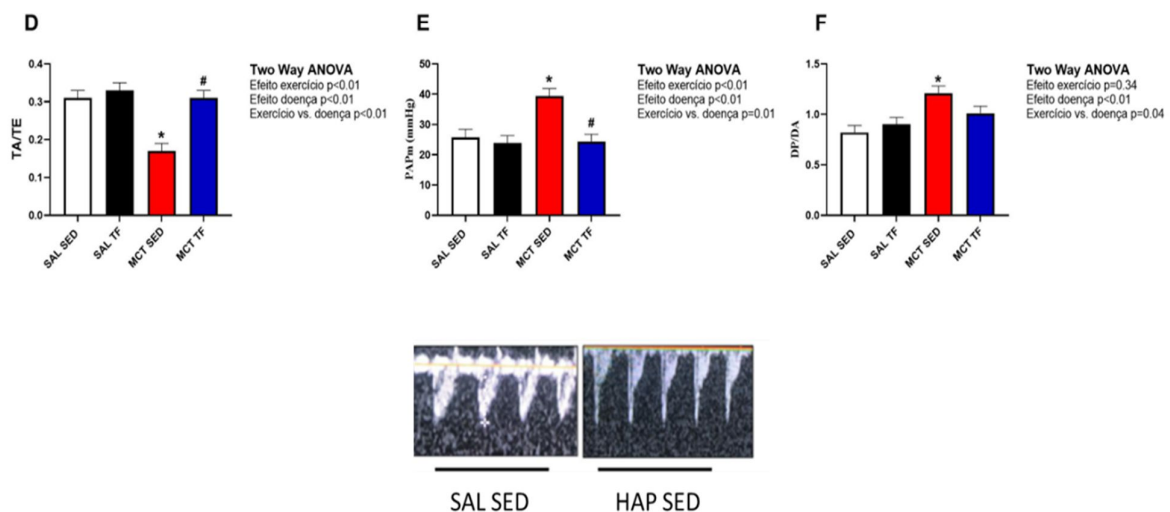
O estabelecimento da HAP foi confirmado na 2ª semana após a injeção de MCT. A análise ecocardiográfica demonstrou a redução da razão TAc/TE e aumento da razão DP/DA nos grupos MCT em relação aos grupos salina (fator doença  $p < 0,01$ ; Figura 2. Painéis A e C), indicando o aumento da RVP. Como esperado, os grupos MCT apresentaram aumento da PAPm em relação aos grupos salina (fator doença  $p < 0,01$ ; Figura 2. Painel B). Observamos o entalhe na onda de fluxo da artéria pulmonar (Figura 2, painel ilustrativo, no quadrante direito superior), característico tanto em modelos experimentais quanto em pacientes com HAP <sup>(17)</sup>. Estes dados em conjunto confirmam a viabilidade e eficácia do modelo de HAP por MCT utilizado no presente estudo. Ainda, a segunda avaliação ecocardiográfica, realizada ao fim das 4 semanas de TF, demonstrou que essas alterações permaneceram presentes no grupo MCT-SED, enquanto o TF mostrou-se capaz de reverter as alterações dos indicadores de RVP e PAPm (painéis D-F) no grupo MCT-TF, visto que não houve diferença entre esse grupo e o grupo SAL-SED.



## 14 dias- pós MCT (Pré TF)



## 43 dias- pós MCT (Fim do TF)



**Figura 2.** Indicadores do estabelecimento de hipertensão arterial pulmonar. Painéis A-C: Indicador ecocardiográfico da resistência vascular pulmonar (Razão TAc/TE e DP/DA) e PAPm obtido na 2ª semana após dose subcutânea de 40 mg/Kg de monocrotalina ou salina. Painel D-F: imagens obtidas após o fim do treinamento físico. Imagens representativas do fluxo da artéria pulmonar em animal exposto à salina e o formato de adaga (entalhe) no animal submetido à injeção de monocrotalina (imagem inferior). Grupos: salina sedentário (SAL-SED) ou treinado (SAL-TF), monocrotalina sedentário (MCT-SED) e treinado (MCT-TF). Dados apresentados em média  $\pm$  DP. Anova two-way, @ =  $p \leq 0,05$  vs. SAL; \* =  $p \leq 0,05$  vs. SAL-SED; # =  $p \leq 0,05$  vs. MCT-SED;

### Estresse oxidativo no músculo gastrocnêmio

Os dados da Figura 3 apresentam a análise de estresse oxidativo do músculo gastrocnêmio.

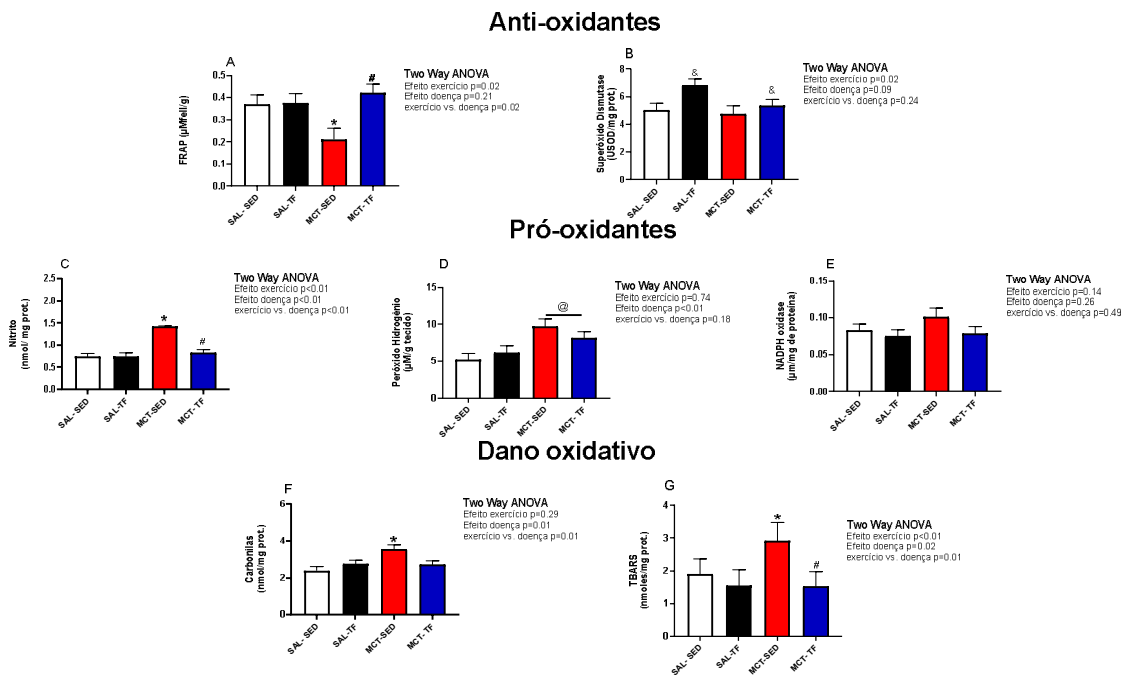
Observamos que o grupo MCT-SED apresentou redução da atividade FRAP quando comparado ao grupo SAL-SED (Painel A). Por outro lado, o TF aumentou a defesa antioxidante FRAP nos animais com HAP quando comparado ao grupo sedentário ( $P = 0,01$ , MCT-T vs.

MCT-SED) e normalizou seus valores para próximo do grupo controle saudável (SAL-SED). Ainda, o TF promoveu aumento do da enzima antioxidante SOD em ambos os grupos SAL e MCT ( $P_{\text{exercício}} = 0,02$ ; Paineis B).

Os parâmetros pró-oxidantes do músculo gastrocnêmio são observados nos painéis C, D e E. Independentemente do fator treinamento físico, a indução de HAP por monocrotalina promoveu aumento do peróxido de hidrogênio nos grupos MCT em relação aos grupos salina ( $P_{\text{doença}} = <0,01$ ; Paineis D). Não foram identificadas modificações na atuação da NADPH oxidase (painel E).

Além disso, houve aumento do nitrito no grupo MCT-SED em relação ao grupo SAL-SED (painel C). Por outro lado, o TF reduziu a atuação deste pro-oxidante no grupo MCT-TF em relação ao MCT-SED ( $P = <0,01$ ) e normalizou os seus valores para próximo do grupo controle saudável (SAL-SED).

Com relação aos parâmetros de dano oxidativo no músculo gastrocnêmio. A HAP promoveu aumento da oxidação de proteínas (carbonilas) e da peroxidação lipídica (TBARS) no grupo MCT-SED em relação ao grupo SAL-SED (painéis F e G, respectivamente). Por outro lado, o TF promoveu redução de peroxidação lipídica no grupo MCT-TF em relação ao MCT-SED ( $P = <0,01$ ), normalizando os valores dessa variável para próximo do grupo controle saudável (SAL-SED) (painel G). Não houve diferença entre os grupos MCT-TF e SAL-SED, demonstrando atenuação do dano oxidativo a proteínas no grupo monocrotalina submetido à TF (painel F).



**Figura 3.** Marcadores de estresse oxidativo no músculo gastrocnêmio. (A) FRAP ( $\mu\text{MFe}$ ); (B) Superóxido Dismutase (USOD/mg prot.); (C) Nitrito (nmol/mg prot.), (D) Peróxido Hidrogênio ( $\mu\text{M}$ ); (E) NADPH oxidase ( $\mu\text{mol/mg}$  de prot.); (F) Carbonilas (nmol/mg prot.) e (G) TBARS (nmol/mg prot.). FRAP = Ferric Reducing Antioxxant Power, TBARS = Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico, e Grupos salina sedentário (SAL-SED) e treinado (SAL-TF). Grupos monocrotalina sedentário (MCT-SED) e treinado (MCT-TF). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. Anova two-way, \*  $p \leq 0,05$  vs. SAL-SED; #  $p \leq 0,05$  vs. MCT-SED; &  $p \leq 0,05$  vs. grupos sedentários, @ =  $p \leq 0,05$  vs. SAL

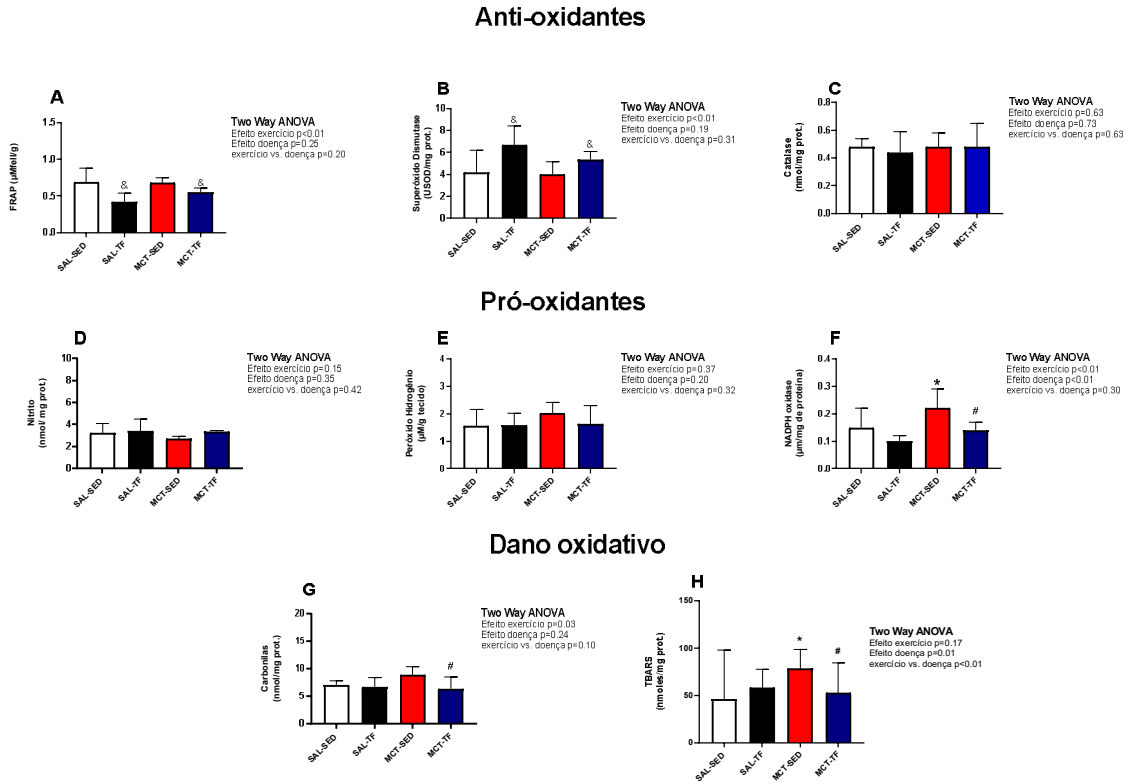
### Estresse oxidativo no músculo diafragma

Os dados da Figura 4 apresentam a análise de estresse oxidativo do músculo diafragma.

Os grupos sedentários não diferiram para os marcadores antioxidantes neste tecido. Contudo, observamos que o TF reduziu a FRAP e promoveu o aumento da atividade da enzima SOD nos grupos SAL ou monocrotalina (painéis A e B, respectivamente). Os parâmetros pró-oxidantes do músculo diafragma são observados nos painéis D, E e F. Não houve diferenças para peróxido de hidrogênio e nitrito. Observamos que a indução de HAP por monocrotalina promoveu aumento da NADPH oxidase (painel F) no grupo MCT-SED em relação ao grupo SAL-SED. Por outro lado, o TF conseguiu prevenir esse aumento, visto que não houve diferença entre os grupos MCT-TF e SAL-SED.

Com relação aos parâmetros de dano oxidativo no músculo diafragma, a HAP promoveu aumento da peroxidação da membrana lipídica avaliada por TBARS (painel H) no grupo MCT-

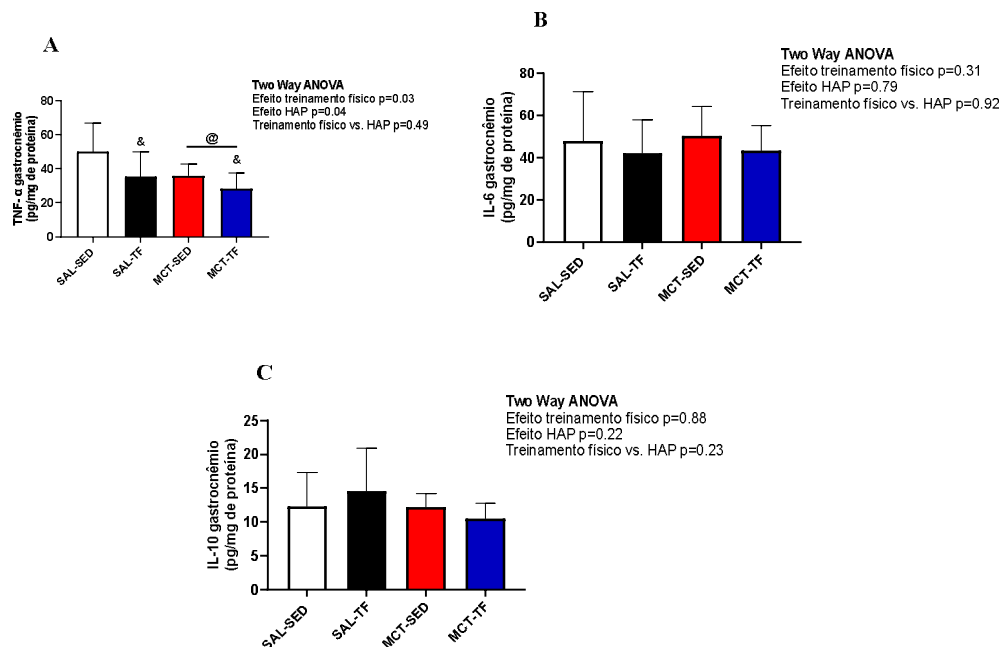
SED. Por outro lado, o TF promoveu redução de TBARS e da oxidação proteica avaliada por carbonilas (painel G) no grupo MCT-TF em relação ao MCT-SED, normalizando os valores dessa variável para próximo do grupo controle saudável (SAL-SED).



**Figura 4.** Marcadores de estresse oxidativo no músculo diafragma. (A) FRAP ( $\mu\text{MFe}$ ); (B) Superóxido Dismutase (USOD/mg prot.); (C) Catalase (nmol/mg prot.) (D) Nitrito (nmol/mg prot.), (E) Peróxido Hidrogênio ( $\mu\text{M}$ ); (F) NADPH oxidase ( $\mu\text{mol/mg}$  de prot.); (G) Carbonilas (nmol/mg prot.) e (H) TBARS (nmol/mg prot.). FRAP = Ferric Reducing Antioxxant Power, TBARS = Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico, e Grupos salina sedentário (SAL-SED) e treinado (SAL-TF). Grupos monocrotalina sedentário (MCT-SED) e treinado (MCT-TF). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. Anova two-way, \*  $p \leq 0,05$  vs. SAL-SED; #  $p \leq 0,05$  vs. MCT-SED; &  $p \leq 0,05$  vs. grupos sedentários.

### Mediadores Inflamatórios no músculo gastrocnêmio

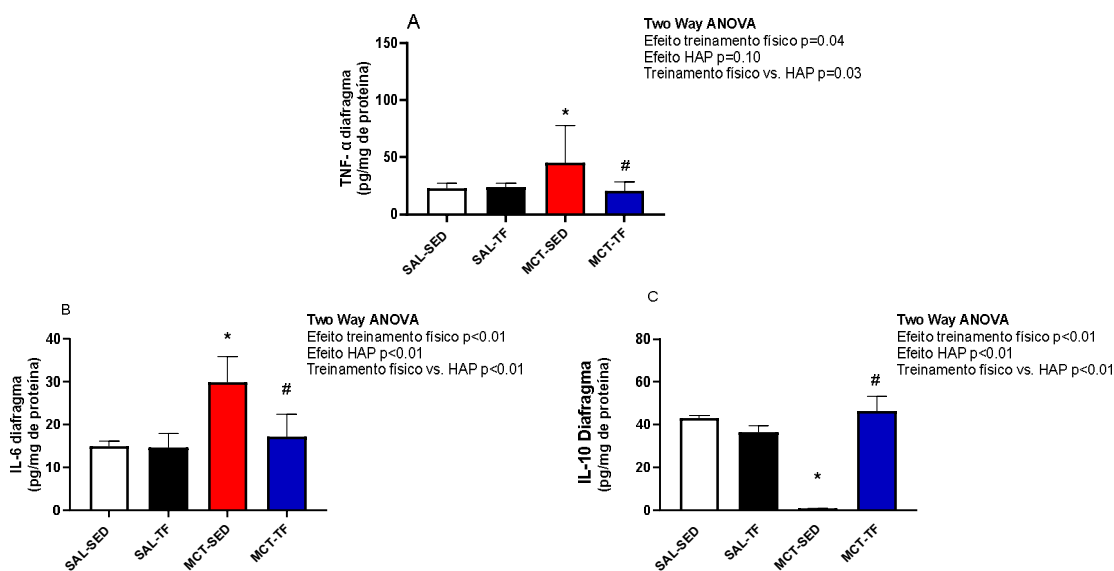
Na Figura 5 observamos as avaliações de mediadores inflamatórios no músculo gastrocnêmio. No painel A demonstramos que ambas as intervenções (Efeito do TF e efeito HAP), promoveram redução do TNF- $\alpha$ . Não foram observados efeito da doença ou do TF para IL-6 e IL-10.



**Figura 5.** Mediadores inflamatórios no músculo gastrocnêmio. (A) TNF- $\alpha$  (pg/ mg de proteína), (B) IL-6 (pg/ mg de proteína) e (C) IL-10 (pg/ mg de proteína). Grupos salina sedentário (SAL-SED) e treinado (SAL-TF). Grupos monocrotalina sedentário (MCT-SED) e treinado (MCT-TF). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. Anova two-way, @ p $\leq$  0,05 vs. grupos salina; & p $\leq$  0,05 vs. grupos sedentários.

### Mediadores Inflamatórios no músculo diafragma

Na Figura 6 observamos as avaliações dos mediadores inflamatórios no músculo diafragma. A HAP por MCT promoveu aumento de mediadores pró-inflamatórios TNF-  $\alpha$  e IL-6 e redução da citocina anti-inflamatória IL-10 (Painéis A-C, respectivamente). Por outro lado, o TF no grupo MCT preveniu todas essas alterações em relação ao grupo MCT-SED e normalizou essas variáveis para níveis similares aos do grupo SAL-SED.



**Figura 6.** Mediadores inflamatórios no músculo diafragma. (A) TNF- $\alpha$  (pg/ mg de proteína), (B) IL-6 (pg/ mg de proteína) e (C) IL-10 (pg/ mg de proteína). Grupos salina sedentário (SAL-SED) e treinado (SAL-TF). Grupos monocrotalina sedentário (MCT-SED) e treinado (MCT-TF). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. Anova two-way, \*  $p \leq 0,05$  vs. SAL-S; #  $p \leq 0,05$  vs. MCT-S.

### 3.2.7 DISCUSSÃO

Nossos dados demonstram que o modelo experimental de HAP cursa com a redução de defesa antioxidante, aumento de pró-oxidantes e de dano oxidativo na musculatura esquelética periférica (gastrocnêmio). Adicionalmente, a HAP promoveu aumento de pró-oxidantes e de dano oxidativo, além de aumento de mediadores pro-inflamatórios e redução de IL-10 na musculatura respiratória (diafragma). Por outro lado, dados originais deste estudo evidenciam que o TF combinado, de moderada intensidade, normaliza parcialmente o balanço redox na musculatura periférica e respiratória na HAP. Adicionalmente, o TF reduz o TNF- $\alpha$  na musculatura periférica, bem como normaliza os mediadores inflamatórios na musculatura respiratória. Tais resultados corroboram a hipótese do estudo de que o TF combinado de moderada intensidade previne as alterações de estresse oxidativo e inflamação na musculatura periférica e respiratória na HAP.

### **Modelo de HAP por MCT**

Os modelos experimentais para o estudo da HAP permitiram o desenvolvimento de todas as alternativas terapêuticas atualmente existentes <sup>(131, 132)</sup>. O modelo mais utilizado para mimetizar a HAP é gerado através da administração de MCT<sup>(133)</sup>, uma vez que sua aplicação é simples, oferecendo facilidade e rapidez para reproduzir o modelo<sup>(134)</sup>. Além disso, as alterações cardiovasculares e pulmonares geradas são muito similares às dos pacientes com HAP<sup>(135)</sup>, bem como os parâmetros funcionais e bioquímicos <sup>(136)</sup>. Utilizando a MCT, obtivemos o aumento da RVP e PAPm via marcadores ecocardiográficos.

### **Efeito do TF combinado sobre os marcadores de inflamação e de estresse oxidativo na HAP**

Um importante mecanismo envolvido na fisiopatologia da HAP corresponde a formação exacerbada de espécies reativas de oxigênio. A oxidação corresponde a um processo fundamental da vida aeróbia e do metabolismo celular, produzindo espécies reativas de forma natural ou devido a alguma disfunção biológica. Especificamente na HAP, o perfil inflamatório e o estresse oxidativo, constituído pelo desbalanço entre pró-oxidantes e antioxidantes, atuam de forma contínua no remodelamento da vasculatura pulmonar, contribuindo para a vasoconstrição crônica e aumento da RVP.<sup>(100)</sup> Nos últimos anos, evidências robustas têm demonstrado que a cascata inflamatória e o estresse oxidativo participam também das alterações morfofuncionais que contribuem para fraqueza da musculatura periférica <sup>(14)</sup> e respiratória. <sup>(137)</sup> Por exemplo, Ahmed et al. em 2014 <sup>(138)</sup> demonstraram que o uso de MCT causa uma série de efeitos deletérios no organismo, com aumento de mediadores inflamatórios (TNF- $\alpha$ ), redução de atividade antioxidante (glutathione) e aumento de lipoperoxidação (TBARS) no pulmão e coração. Nossos achados estão alinhados com a literatura atual ao demonstrar que o MCT reduz a atividade antioxidante (FRAP), aumenta a atividade pró-oxidante (nitrito e peróxido de hidrogênio em gastrocnêmio; NADPH oxidase em diafragma) e lipoperoxidação lipídica (TBARS) na musculatura periférica e respiratória. Estes dados em conjunto corroboram que os efeitos deletérios da HAP são sistêmicos e não limitados à vasculatura pulmonar e coração. Ainda, a HAP via MCT promoveu aumento de mediadores inflamatórios (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) no diafragma. Contudo, de maneira interessante, observamos redução do TNF- $\alpha$  no músculo gastrocnêmio na HAP vs SAL (fator principal doença). A redução desse marcador inflamatório no grupo HAP, independentemente do fator exercício, pode representar um mecanismo compensatório inicial em resposta ao aumento de espécies reativas de oxigênio no músculo gastrocnêmio.

Por outro lado, o TF tem sido apontado como estratégia efetiva em normalizar parcialmente as disfunções inflamatórias e de estresse oxidativo em diversas populações. Especificamente na HAP, o TF aeróbio combinado ao resistido é amplamente utilizado nos protocolos de reabilitação, sendo considerados eficaz e seguro para pacientes com HAP estáveis.<sup>(19)</sup> Contudo, o presente estudo, segundo nosso levantamento de literatura, é o primeiro a investigar os efeitos dessa modalidade de TF sobre os parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo na musculatura periférica e respiratória na HAP. Especificamente, nossos resultados demonstraram que enquanto o modelo experimental de HAP cursa com redução de antioxidantes (FRAP), aumento de pró-oxidantes (peróxido de hidrogênio) e dano oxidativo em músculo gastrocnêmio, o TF combinado desempenha papel protetor na musculatura periférica, com aumento da atuação de defesa antioxidante (atividade da SOD), redução de pro-oxidantes (nitrito) e do dano oxidativo (TBARS e Carbonilas). De fato, evidências anteriores corroboram tais achados e demonstraram que TF aeróbio realizado em ratos machos Wistar com HAP induzida por MCT, atenua o estresse oxidativo do músculo gastrocnêmio, com aumento de atividade antioxidante (SOD e Catalase) e redução da lipoperoxidação<sup>(14)</sup>. A SOD é a primeira enzima atuar na defesa antioxidante<sup>(139)</sup>, e este aumento pode justificar a redução de danos oxidativo por lipoperoxidação. De fato, o aumento de defesa antioxidante promove melhores desfechos na HAP. Neste sentido, o tratamento com o antioxidante EUK-134 que mimetiza a atuação da SOD/CAT reduz o estresse oxidativo, a sinalização pro-apoptótica e a fibrose intersticial<sup>(140)</sup>.

Os mecanismos envolvidos em um perfil inflamatório e de estresse oxidativo na HAP ainda são poucos estabelecido. No entanto, evidências sugerem que a disfunção autonômica presente na HAP, mais precisamente a hiperativação simpática, estimulam a cascata inflamatória e o desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes<sup>(99, 100, 107)</sup>. De fato, Zimmer et al.<sup>(100)</sup> demonstraram que na terceira semana após o estabelecimento da HAP por MCT, os animais apresentaram infiltrado de células inflamatórias e redução da SOD no tecido cardíaco, que por sua vez, correlacionou-se com aumento do índice LF/HF da variabilidade da frequência cardíaca (um indicador de disfunção autonômica com predominância simpática). Esses autores também observaram elevados valores de peróxido de hidrogênio que pode promover a indução da atividade da CAT durante a fase inicial da HAP para evitar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Neste sentido, um dos mecanismos envolvidos na redução da cascata inflamatória e de estresse oxidativo pós treinamento físico nessa população poderia ser a melhora do perfil autonômico.<sup>(121)</sup> De fato, evidências robustas demonstram que o TF per se aumenta a



modulação vagal e reduz a modulação simpática cardiovascular<sup>(19, 121)</sup>, o que poderia atuar modulando favoravelmente o processo inflamatório e balanço redox.<sup>(22, 60, 117)</sup>

### **3.2.8 CONCLUSÃO**

O modelo experimental de HAP cursa com aumento do estresse oxidativo em musculatura periférica e promove aumento de pró-oxidante, de dano oxidativo, de mediadores pro-inflamatórios e redução de mediadores anti-inflamatório na musculatura respiratória. Em contrapartida, o TF combinado, de moderada intensidade, normaliza parcialmente o balanço redox e o perfil inflamatório na musculatura periférica e respiratória na HAP. Tais achados em conjunto corroboram o TF combinado como uma importante ferramenta não farmacológica adjuvante no tratamento de pacientes com HAP.

---

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A HAP é uma doença progressiva e de prognóstico desfavorável. As evidências acumuladas nos últimos 10 anos e apresentadas no estudo I reforçam que a fisiopatologia da HAP envolve não só os sistemas cardiovascular e pulmonar, englobando também o sistema musculoesquelético. Além disso, os dados originais apresentados no estudo II corroboram o entendimento de que as alterações no perfil inflamatório e balanço redox ocorrem na musculatura periférica e respiratória na HAP estável e apontam o TF combinado de moderada intensidade como estratégia terapêutica eficaz em prevenir tais alterações.

## 5. REFERÊNCIAS

1. 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).
2. Humbert M, Kovacs G, Hoeper MM, Badagliacca R, Berger RMF, Brida M, et al. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J*. 2022;43(38):3618-731.
3. Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, Archer SL. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *Bmj*. 2018;360:j5492.
4. Galiè 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). *Eur Heart J*. 2016;37(1):67-119.
5. Ruopp NF, Cockrill BA. Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: A Review. *Jama*. 2022;327(14):1379-91.
6. 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.
7. 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.
8. Farber HW, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine*. 2004;351(16):1655-65.
9. Hambly N, Alawfi F, Mehta S. Pulmonary hypertension: diagnostic approach and optimal management. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2016;188(11):804-12.
10. Shoemaker MJ, Wilt JL, Dasgupta R, Oudiz RJ. Exercise training in patients with pulmonary arterial hypertension: a case report. *Cardiopulmonary physical therapy journal*. 2009;20(4):12-8.
11. Demarco VG, Whaley-Connell AT, Sowers JR, Habibi J, Dellsperger KC. Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. *World journal of cardiology*. 2010;2(10):316-24.
12. Riou M, Pizzimenti M, Enache I, Charloux A, Canuet M, Andres E, et al. Skeletal and Respiratory Muscle Dysfunctions in Pulmonary Arterial Hypertension. *J Clin Med*. 2020;9(2).
13. Ahn B, Empinado HM, Al-Rajhi M, Judge AR, Ferreira LF. Diaphragm atrophy and contractile dysfunction in a murine model of pulmonary hypertension. *PloS one*. 2013;8(4):e62702.
14. Becker CU, Sartório CL, Campos-Carraro C, Siqueira R, Colombo R, Zimmer A, Belló-Klein A. Exercise training decreases oxidative stress in skeletal muscle of rats with pulmonary arterial hypertension. *Archives of physiology and biochemistry*. 2022;128(5):1330-8.
15. Moreira-Goncalves D, Padrao AI, Ferreira R, Justino J, Nogueira-Ferreira R, Neuparth MJ, et al. Signaling pathways underlying skeletal muscle wasting in

experimental pulmonary arterial hypertension. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(12):2722-31.

16. Powers SK, Ji LL, Kavazis AN, Jackson MJ. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Comprehensive Physiology*. 2011;1(2):941-69.

17. Malenfant S, Lebret M, Breton-Gagnon É, Potus F, Paulin R, Bonnet S, Provencher S. 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).

18. Dalla Vecchia LA, Bussotti M. Exercise training in pulmonary arterial hypertension. *Journal of thoracic disease*. 2018;10(1):508-21.

19. 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).

20. Vieira JS, Cunha TF, Paixao NA, Dourado PM, Carrascoza LS, Bacurau AVN, Brum PC. Exercise intolerance establishment in pulmonary hypertension: Preventive effect of aerobic exercise training. *Life Sci*. 2020;261:118298.

21. 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.

22. 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.

23. Stickland MK, Miller JD, Smith CA, Dempsey JA. Carotid chemoreceptor modulation of regional blood flow distribution during exercise in health and chronic heart failure. *Circulation research*. 2007;100(9):1371-8.

24. Stickland MK, Fuhr DP, Haykowsky MJ, Jones KE, Paterson DI, Ezekowitz JA, McMurtry MS. Carotid chemoreceptor modulation of blood flow during exercise in healthy humans. *The Journal of physiology*. 2011;589(Pt 24):6219-30.

25. van de Borne P, Oren R, Somers VK. Dopamine depresses minute ventilation in patients with heart failure. *Circulation*. 1998;98(2):126-31.

26. Edgell H, Stickland MK. Activation of the carotid chemoreflex secondary to muscle metaboreflex stimulation in men. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2014;306(9):R693-700.

27. Biscoe TJ, Purves MJ, Sampson SR. The frequency of nerve impulses in single carotid body chemoreceptor afferent fibres recorded in vivo with intact circulation. *The Journal of physiology*. 1970;208(1):121-31.

28. La Rovere MT, Specchia G, Mortara A, Schwartz PJ. Baroreflex sensitivity, clinical correlates, and cardiovascular mortality among patients with a first myocardial infarction. A prospective study. *Circulation*. 1988;78(4):816-24.

29. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RDCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*. 2010;23(4):629-43.

30. Bowers R, Cool C, Murphy RC, Tudor RM, Hopken MW, Flores SC, Voelkel NF. Oxidative stress in severe pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;169(6):764-9.

31. Crosswhite P, Sun Z. Nitric oxide, oxidative stress and inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Journal of Hypertension*. 2010;28(2):201-12.

32. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. 2006;29.

33. Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum*. 1980;492:153-68.
34. Da Silva AN. Associação entre exercício físico e produção de espécies reativas de oxigênio. *Revista Brasileira de Fisiologia do exercício*. 2014;13(2):116-26.
35. Zhang CF, Zhao FY, Xu SL, Liu J, Xing XQ, Yang J. Autophagy in pulmonary hypertension: Emerging roles and therapeutic implications. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(10):16755-67.
36. Belló-Klein A, Bock PM, Travacio M, Senna SM, Llesuy S, de Bittencourt PI, Jr., et al. Myocardial oxidative stress and antioxidants in hypertension as a result of nitric oxide synthase inhibition. *Cardiovascular toxicology*. 2001;1(1):43-50.
37. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*. 1986;320(6061):454-6.
38. Dormandy TL. Free-radical oxidation and antioxidants. *Lancet (London, England)*. 1978;1(8065):647-50.
39. Halliwell B. The antioxidant paradox. *Lancet (London, England)*. 2000;355(9210):1179-80.
40. Hassoun PM, Mouthon L, Barberà JA, Eddahibi S, Flores SC, Grimminger F, et al. Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;54(1 Suppl):S10-s9.
41. Farahmand F, Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. *Molecular and cellular biochemistry*. 2004;260(1-2):21-9.
42. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, et al. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circulation research*. 1999;85(4):357-63.
43. Peng JJ, Liu B, Xu JY, Peng J, Luo XJ. NADPH oxidase: its potential role in promotion of pulmonary arterial hypertension. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2017;390(4):331-8.
44. Machado BH, Bonagamba LG. Microinjection of S-nitrosocysteine into the nucleus tractus solitarius of conscious rats decreases arterial pressure but L-glutamate does not. *European journal of pharmacology*. 1992;221(1):179-82.
45. Lüscher TF, Seo BG, Bühler FR. Potential role of endothelin in hypertension. Controversy on endothelin in hypertension. *Hypertension*. 1993;21(6\_pt\_1):752-7.
46. Reinhardt RR, Bondy CA. Differential cellular pattern of gene expression for two distinct cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases in developing and mature rat brain. *Neuroscience*. 1996;72(2):567-78.
47. Szmítko PE, Wang C-H, Weisel RD, De Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New Markers of Inflammation and Endothelial Cell Activation. *Circulation*. 2003;108(16):1917-23.
48. Dorfmueller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal*. 2003;22(2):358-63.
49. Reid MB, Lännergren J, Westerblad H. Respiratory and limb muscle weakness induced by tumor necrosis factor-alpha: involvement of muscle myofilaments. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;166(4):479-84.
50. Janssen SP, Gayan-Ramirez G, Van den Bergh A, Herijgers P, Maes K, Verbeken E, Decramer M. Interleukin-6 causes myocardial failure and skeletal muscle atrophy in rats. *Circulation*. 2005;111(8):996-1005.

51. Batt J, Ahmed SS, Correa J, Bain A, Granton J. Skeletal muscle dysfunction in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2014;50(1):74-86.
52. Marra AM, Arcopinto M, Bossone E, Ehlken N, Cittadini A, Grünig E. Pulmonary arterial hypertension-related myopathy: an overview of current data and future perspectives. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2015;25(2):131-9.
53. Li W, Moylan JS, Chambers MA, Smith J, Reid MB. Interleukin-1 stimulates catabolism in C2C12 myotubes. *American journal of physiology Cell physiology*. 2009;297(3):C706-14.
54. Tsutsui H, Ide T, Hayashidani S, Suematsu N, Shiomi T, Wen J, et al. Enhanced generation of reactive oxygen species in the limb skeletal muscles from a murine infarct model of heart failure. *Circulation*. 2001;104(2):134-6.
55. Lajoie AC, Bonnet S, Provencher S. Combination therapy in pulmonary arterial hypertension: recent accomplishments and future challenges. *Pulmonary circulation*. 2017;7(2):312-25.
56. 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.
57. 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.
58. Janini Gomes M, Sabela AK, Ferreira ITP, de Souza SLB, Mota GAF, da Silva VL, et al. Effects of aerobic exercise on cardiac function and gene expression of NADPH oxidases in diaphragm muscle of rats with aortic stenosis-induced heart failure. *Front Physiol*. 2023;14:1182303.
59. Hambrecht R, Niebauer J, Fiehn E, Kälberer B, Offner B, Hauer K, et al. Physical training in patients with stable chronic heart failure: effects on cardiorespiratory fitness and ultrastructural abnormalities of leg muscles. *Journal of the American College of Cardiology*. 1995;25(6):1239-49.
60. Colombo R, Siqueira R, Conzatti A, de Lima Seolin BG, Fernandes TR, Godoy AE, et al. Exercise training contributes to H(2)O(2)/VEGF signaling in the lung of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Vascul Pharmacol*. 2016;87:49-59.
61. Souza-Rabbo MP, Silva LF, Auzani JA, Picoral M, Khaper N, Belló-Klein A. EFFECTS OF A CHRONIC EXERCISE TRAINING PROTOCOL ON OXIDATIVE STRESS AND RIGHT VENTRICULAR HYPERTROPHY IN MONOCROTALINE-TREATED RATS. 2008;35(8):944-8.
62. Nogueira-Ferreira R, Moreira-Goncalves D, Santos M, Trindade F, Ferreira R, Henriques-Coelho T. Mechanisms underlying the impact of exercise training in pulmonary arterial hypertension. *Respir Med*. 2018;134:70-8.
63. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43(12 Suppl S):13S-24S.

64. Coons JC, Pogue K, Kolodziej AR, Hirsch GA, George MP. Pulmonary Arterial Hypertension: a Pharmacotherapeutic Update. *Curr Cardiol Rep.* 2019;21(11):141.
65. 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.
66. Beshay S, Sahay S, Humbert M. Evaluation and management of pulmonary arterial hypertension. *Respir Med.* 2020;171:106099.
67. Lau EM, Tamura Y, McGoon MD, Sitbon O. The 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: a practical chronicle of progress. *The European respiratory journal.* 2015;46(4):879-82.
68. 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.
69. Malenfant S, Lebreton M, Breton-Gagnon E, Potus F, Paulin R, Bonnet S, Provencher S. 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).
70. Tran DL, Lau EMT, Celermajer DS, Davis GM, Cordina R. Pathophysiology of exercise intolerance in pulmonary arterial hypertension. *Respirology.* 2018;23(2):148-59.
71. 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).
72. Raza F, Dharmavaram N, Hess T, Dhingra R, Runo J, Chybowsky A, et al. Distinguishing exercise intolerance in early-stage pulmonary hypertension with invasive exercise hemodynamics: Rest V(E) /VCO(2) and ETCO(2) identify pulmonary vascular disease. *Clin Cardiol.* 2022;45(7):742-51.
73. Manders E, Bogaard HJ, Handoko ML, van de Veerdonk MC, Keogh A, Westerhof N, et al. Contractile dysfunction of left ventricular cardiomyocytes in patients with pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology.* 2014;64(1):28-37.
74. Paula-Ribeiro M, Ribeiro IC, Aranda LC, Silva TM, Costa CM, Ramos RP, et al. Cardiac baroreflex dysfunction in patients with pulmonary arterial hypertension at rest and during orthostatic stress: role of the peripheral chemoreflex. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985).* 2021;131(2):794-807.
75. Paula-Ribeiro M, Ribeiro IC, Aranda LC, Silva TM, Costa CM, Ramos RP, et al. Carotid chemoreflex activity restrains post-exercise cardiac autonomic control in healthy humans and in patients with pulmonary arterial hypertension. *The Journal of physiology.* 2019;597(5):1347-60.
76. Santos CMD, Pimenta CADM, Nobre MRC. The PICO strategy for the research question construction and evidence search. *Revista Latino-Americana de Enfermagem.* 2007;15(3):508-11.
77. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Medicine.* 2009;6(7):e1000097.
78. Hooijmans CR, Rovers MM, de Vries RB, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol.* 2014;14:43.

79. Slim K, Nini E, Forestier D, Kwiatkowski F, Panis Y, Chipponi J. Methodological index for non-randomized studies (minors): development and validation of a new instrument. *ANZ journal of surgery*. 2003;73(9):712-6.
80. Spruijt OA, de Man FS, Groepenhoff H, Oosterveer F, Westerhof N, Vonk-Noordegraaf A, Bogaard HJ. The effects of exercise on right ventricular contractility and right ventricular-arterial coupling in pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2015;191(9):1050-7.
81. Breda AP, Pereira de Albuquerque AL, Jardim C, Morinaga LK, Suesada MM, Fernandes CJ, et al. Skeletal muscle abnormalities in pulmonary arterial hypertension. *PloS one*. 2014;9(12):e114101.
82. Malenfant S, Potus F, Mainguy V, Leblanc E, Malenfant M, Ribeiro F, et al. Impaired Skeletal Muscle Oxygenation and Exercise Tolerance in Pulmonary Hypertension. *Med Sci Sports Exerc*. 2015;47(11):2273-82.
83. Malenfant S, Potus F, Fournier F, Breuils-Bonnet S, Pflieger A, Bourassa S, et al. Skeletal muscle proteomic signature and metabolic impairment in pulmonary hypertension. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2015;93(5):573-84.
84. Al-Naamani N, Palevsky HI, Lederer DJ, Horn EM, Mathai SC, Roberts KE, et al. Prognostic Significance of Biomarkers in Pulmonary Arterial Hypertension. *Annals of the American Thoracic Society*. 2016;13(1):25-30.
85. Spiesshoefer J, Herkenrath S, Mohr M, Randerath W, Tuleta I, Diller GP, et al. Diaphragm function does not independently predict exercise intolerance in patients with precapillary pulmonary hypertension after adjustment for right ventricular function. *Bioscience reports*. 2019;39(9).
86. Göransson C, Vejlstup N, Carlsen J. Reproducibility of peak filling and peak emptying rate determined by cardiovascular magnetic resonance imaging for assessment of biventricular systolic and diastolic dysfunction in patients with pulmonary arterial hypertension. *The international journal of cardiovascular imaging*. 2018;34(5):777-86.
87. Pacagnelli FL, Sabela AK, Mariano TB, Ozaki GA, Castoldi RC, Carmo EM, et al. Fractal Dimension in Quantifying Experimental-Pulmonary-Hypertension-Induced Cardiac Dysfunction in Rats. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2016;107(1):33-9.
88. Schulze KM, Weber RE, Colburn TD, Horn AG, Ade CJ, Hsu WW, et al. The effects of pulmonary hypertension on skeletal muscle oxygen pressures in contracting rat spinotrapezius muscle. *Experimental physiology*. 2021;106(10):2070-82.
89. Alencar AK, Montes GC, Montagnoli T, Silva AM, Martinez ST, Fraga AG, et al. Activation of GPER ameliorates experimental pulmonary hypertension in male rats. *Eur J Pharm Sci*. 2017;97:208-17.
90. Alencar AKN, Montes GC, Costa DG, Mendes LVP, Silva AMS, Martinez ST, et al. Cardioprotection Induced by Activation of GPER in Ovariectomized Rats With Pulmonary Hypertension. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2018;73(9):1158-66.
91. Moreira-Gonçalves D, Padrão AI, Ferreira R, Justino J, Nogueira-Ferreira R, Neuparth MJ, et al. Signaling pathways underlying skeletal muscle wasting in experimental pulmonary arterial hypertension. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1852(12):2722-31.
92. Cannon DT, Nogueira L, Gutierrez-Gonzalez AK, Gilmore NK, Bigby TD, Breen EC. Role of IL-33 receptor (ST2) deletion in diaphragm contractile and mitochondrial function in the Sugden5416/hypoxia model of pulmonary hypertension. *Respir Physiol Neurobiol*. 2022;295:103783.



93. Enache I, Charles AL, Bouitbir J, Favret F, Zoll J, Metzger D, et al. Skeletal muscle mitochondrial dysfunction precedes right ventricular impairment in experimental pulmonary hypertension. *Molecular and cellular biochemistry*. 2013;373(1-2):161-70.
94. Kosmas K, Michael Z, Papathanasiou AE, Spyropoulos F, Adib E, Jasuja R, Christou H. Skeletal Muscle Dysfunction in Experimental Pulmonary Hypertension. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(18).
95. 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.
96. Long GM, Troutman AD, Gray DA, Fisher AJ, Lahm T, Coggan AR, Brown MB. Skeletal muscle blood flow during exercise is reduced in a rat model of pulmonary hypertension. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2022;323(4):R561-R70.
97. Garfield BE, Crosby A, Shao D, Yang P, Read C, Sawiak S, et al. Growth/differentiation factor 15 causes TGF $\beta$ -activated kinase 1-dependent muscle atrophy in pulmonary arterial hypertension. *Thorax*. 2019;74(2):164-76.
98. Potus F, Malenfant S, Graydon C, Mainguy V, Tremblay E, Breuils-Bonnet S, et al. Impaired angiogenesis and peripheral muscle microcirculation loss contribute to exercise intolerance in pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014;190(3):318-28.
99. Vaillancourt M, Chia P, Sarji S, Nguyen J, Hoftman N, Ruffenach G, et al. Autonomic nervous system involvement in pulmonary arterial hypertension. *Respiratory research*. 2017;18(1):201.
100. Zimmer A, Teixeira RB, Bonetto JHP, Bahr AC, Turck P, de Castro AL, et al. Role of inflammation, oxidative stress, and autonomic nervous system activation during the development of right and left cardiac remodeling in experimental pulmonary arterial hypertension. *Molecular and cellular biochemistry*. 2020;464(1-2):93-109.
101. Brown SD, Clark C, Gutierrez G. Pulmonary lactate release in patients with sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *J Crit Care*. 1996;11(1):2-8.
102. Wan Y, Fu J. GDF15 as a key disease target and biomarker: linking chronic lung diseases and ageing. *Molecular and cellular biochemistry*. 2023:1-14.
103. Naeije R, van de Borne P. Clinical relevance of autonomic nervous system disturbances in pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal*. 2009;34(4):792-4.
104. da Silva Gonçalves Bós D, Van Der Bruggen CEE, Kurakula K, Sun XQ, Casali KR, Casali AG, et al. Contribution of Impaired Parasympathetic Activity to Right Ventricular Dysfunction and Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*. 2018;137(9):910-24.
105. Ramos RP, Arakaki JS, Barbosa P, Treptow E, Valois FM, Ferreira EV, et al. Heart rate recovery in pulmonary arterial hypertension: relationship with exercise capacity and prognosis. *American heart journal*. 2012;163(4):580-8.
106. Donnellan E, Wazni OM, Chung MK, Elshazly MB, Chung R, Taigen T, et al. Attenuated heart rate recovery is associated with higher arrhythmia recurrence and mortality following atrial fibrillation ablation. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology*. 2021;23(7):1063-71.
107. Ciarka A, Doan V, Velez-Roa S, Naeije R, van de Borne P. Prognostic significance of sympathetic nervous system activation in pulmonary arterial

- hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;181(11):1269-75.
108. Stickland MK, Smith CA, Soriano BJ, Dempsey JA. Sympathetic restraint of muscle blood flow during hypoxic exercise. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2009;296(5):R1538-46.
109. O'Leary DS, Seamans DP. Effect of exercise on autonomic mechanisms of baroreflex control of heart rate. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 1993;75(5):2251-7.
110. Farquhar WB, Taylor JA, Darling SE, Chase KP, Freeman R. Abnormal baroreflex responses in patients with idiopathic orthostatic intolerance. *Circulation*. 2000;102(25):3086-91.
111. Provencher S, Chemla D, Hervé P, Sitbon O, Humbert M, Simonneau G. Heart rate responses during the 6-minute walk test in pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal*. 2006;27(1):114-20.
112. Prabhakar NR, Peng YJ. Peripheral chemoreceptors in health and disease. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2004;96(1):359-66.
113. Velez-Roa S, Ciarka A, Najem B, Vachier JL, Naeije R, van de Borne P. Increased sympathetic nerve activity in pulmonary artery hypertension. *Circulation*. 2004;110(10):1308-12.
114. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Med Sci Sports Exerc*. 2009;41(3):687-708.
115. Gibala MJ, Little JP, Macdonald MJ, Hawley JA. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. *J Physiol*. 2012;590(5):1077-84.
116. Marzolini S, Oh PI, Brooks D. Effect of combined aerobic and resistance training versus aerobic training alone in individuals with coronary artery disease: a meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol*. 2012;19(1):81-94.
117. 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. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2017;312(2):R197-r210.
118. 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.
119. 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.
120. 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.
121. 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.
122. Feriani DJ, Souza GIH, Carrozzi NM, Mostarda C, Dourado PMM, Consolim-Colombo FM, et al. Impact of exercise training associated to pyridostigmine treatment

on autonomic function and inflammatory profile after myocardial infarction in rats. *Int J Cardiol.* 2017;227:757-65.

123. da Palma RK, Moraes-Silva IC, da Silva Dias D, Shimojo GL, Conti FF, Bernardes N, et al. Resistance or aerobic training decreases blood pressure and improves cardiovascular autonomic control and oxidative stress in hypertensive menopausal rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985).* 2016;121(4):1032-8.

124. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry.* 1951;193(1):265-75.

125. Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in enzymology.* 1999;299:15-27.

126. Marklund SL. Superoxide dismutase isoenzymes in tissues and plasma from New Zealand black mice, nude mice and normal BALB/c mice. *Mutation research.* 1985;148(1-2):129-34.

127. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology.* 1984;105:121-6.

128. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of immunological methods.* 1980;38(1-2):161-70.

129. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical biochemistry.* 1969;27(3):502-22.

130. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry.* 1979;95(2):351-8.

131. Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Yilmaz H, Butrous G, Ermert L, et al. Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2004;169(1):39-45.

132. Clozel M, Hess P, Rey M, Iglarz M, Binkert C, Qiu C. Bosentan, sildenafil, and their combination in the monocrotaline model of pulmonary hypertension in rats. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ).* 2006;231(6):967-73.

133. Polonio IB, Acencio MMP, Pazetti R, Almeida FMD, Canzian M, Silva BSD, et al. Comparação de dois modelos experimentais de hipertensão pulmonar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia.* 2012;38(4):452-60.

134. Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, Farkas D, Kraskauskas D, Voelkel NF, Bogaard HJ. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;302(4):L363-9.

135. Yee SB, Kinser S, Hill DA, Barton CC, Hotchkiss JA, Harkema JR, et al. Synergistic hepatotoxicity from coexposure to bacterial endotoxin and the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. *Toxicology and applied pharmacology.* 2000;166(3):173-85.

136. Brown L, Miller J, Dagger A, Sernia C. Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats. *Journal of cardiovascular pharmacology.* 1998;31(1):108-15.

137. Manders E, de Man FS, Handoko ML, Westerhof N, van Hees HW, Stienen GJ, et al. Diaphragm weakness in pulmonary arterial hypertension: role of sarcomeric dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;303(12):L1070-8.

138. Ahmed LA, Obaid AA, Zaki 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.

139. Linke A, Adams V, Schulze PC, Erbs S, Gielen S, Fiehn E, et al. Antioxidative effects of exercise training in patients with chronic heart failure: increase in radical scavenger enzyme activity in skeletal muscle. *Circulation*. 2005;111(14):1763-70.

140. Redout EM, van der Toorn A, Zuidwijk MJ, van de Kolk CW, van Echteld CJ, Musters RJ, et al. Antioxidant treatment attenuates pulmonary arterial hypertension-induced heart failure. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2010;298(3):H1038-47.

**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–



<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Article Type:</b>	Review Article
<b>Keywords:</b>	pulmonary hypertension; exercise capacity; skeletal muscles; respiratory muscles; hemodynamic.
<b>Corresponding Author:</b>	Marcelle Paula-Ribeiro, PhD Federal University of Sao Paulo Sao Paulo, Outside North America BRAZIL
<b>First Author:</b>	Thaís Freire
<b>Order of Authors:</b>	Thaís Freire Marília Ferreira Katia De Angelis, PhD Marcelle Paula-Ribeiro, PhD
<b>Abstract:</b>	<p>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.</p>
<b>Suggested Reviewers:</b>	<p>Luciana Sampaio, PhD Associate Professor, Ninth of July University - Vila Maria Campus lucianamalosa@uni9.pro.br Has experience in cardiovascular and respiratory mechanisms related to respiratory diseases and PH. Experience in working with respiratory rehabilitation programmes.</p> <p>Tales Lyra, PhD Associate Professor, City University of Sao Caetano do Sul Tales.oliveira@online.uscs.edu.br Experience in studies investigating cardiovascular and autonomic mechanisms in clinical populations. Practical experience in respiratory physiology and working with cardiorespiratory diseases</p> <p>Marília Correia, PhD Associate Professor, Ninth of July University marilia.correia@uni9.pro.br</p>

*Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation*



← Submissions Being Processed for Author ⓘ

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Action  	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted
<a href="#">Action Links</a>	BJPT-D-23-00921	Respiratory, cardiovascular and musculoskeletal mechanisms involved in the pathophysiology of pulmonary hypertension: An updated systematic review of preclinical and clinical studies	Nov 02, 2023

Page 1 of 1 (1 total submissions)