

**AVALIAÇÃO DO COLÁGENO E DAS MIOSINAS CARDÍACAS EM RATOS COM
HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR SUBMETIDOS A TREINAMENTO
PREVENTIVO**

THAOAN BRUNO MARIANO

**AVALIAÇÃO DO COLÁGENO E DAS MIOSINAS CARDÍACAS EM RATOS COM
HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR SUBMETIDOS A TREINAMENTO
PREVENTIVO**

THAOAN BRUNO MARIANO

Dissertação de Mestrado apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Fisiopatologia Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Francis Lopes Pacagnelli

616.132 06 Mariano, Thaoan Bruno.
M333a Avaliação do colágeno e das miosinas cardíacas em ratos com hipertensão arterial pulmonar submetidos a treinamento preventivo / Thaoan Bruno Mariano. – Presidente Prudente, 2015.

45 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2015.

Bibliografia.

Orientador: Francis Lopes Pacagnelli.

1. Disfunção Cardíaca. 2. Hipertensão Pulmonar Arterial. 3. Monocrotalina. 4. Exercícios Preventivos. I. Título.

THAOAN BRUNO MARIANO

**AVALIAÇÃO DO COLÁGENO E DAS MIOSINAS CARDÍACAS EM RATOS
COM HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR SUBMETIDOS A
TREINAMENTO PREVENTIVO**

Dissertação de mestrado apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Presidente Prudente, 22 de março de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Francis Lopes Pacagnelli
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof^o. Dr^o. Robson Francisco Carvalho
Universidade Estadual Paulista – Unesp
Botucatu-SP

Prof^a. Dr^a. Gisele AlborghettiNai
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

A Thays da Silva Garrido pelo apoio em todos os momentos não só desta jornada, mas desde a faculdade. Por todo amor, incentivo, e ajuda em todos os trabalhos.

Aos meus pais Martim e Cristina, e minha irmã Annelise por todo carinho, apoio e ajuda que me deram por toda minha vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Francis Lopes Pacagnelli, por todo conhecimento e incentivo desde a graduação, pelas oportunidades ofertadas de crescimento profissional, por todo carinho e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao Criador que me abençoou e proporcionou conhecimento para esta jornada.

À minha família que sempre me apoiou e acreditou na minha capacidade.

Aos Docentes Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho, Prof. Dr. Katashi Okoshi, Prof. Dr. Antônio Carlos Cicogna, e Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior que colaboraram para a realização deste trabalho.

A Thays Garrido, André Oliveira, Patrícia Takamoto, Mariana Pelosi e Nair de Oliveira por toda ajuda na parte experimental.

Aos colegas Me. Igor de Carvalho Deprá e Dr. Dijon pelo apoio, conhecimento e por toda ajuda na parte experimental deste trabalho.

Aos colegas do Mestrado Ciência Animal e profissionais da UNOESTE de Presidente Prudente e da UNESP de Botucatu, que ajudaram de alguma forma.

Aos Docentes do Mestrado que compartilharam todo conhecimento que possuem, contribuindo com a minha formação.

À UNOESTE, pela oportunidade do Mestrado, bem como toda a sua equipe de profissionais, que tornam esta universidade um lugar de respeito e exemplo a ser seguido.

À Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, que deu todo apoio científico e tecnológico para a realização deste Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior- CAPES, pela bolsa concedida.

À minha orientadora Profa. Dra. Francis Lopes Pacagnelli, que proporcionou esta oportunidade profissional e sempre me incentivou a explorar o máximo da minha capacidade. Sou muito grato pela oportunidade. Obrigado!

A todos os meus sinceros agradecimentos!

“Os homens perdem a saúde para juntar dinheiro, depois perdem o dinheiro para recuperar a saúde. E por pensarem ansiosamente no futuro esquecem do presente de forma que acabam por não viver nem no presente nem no futuro. E vivem como se nunca fossem morrer... e morrem como se nunca tivessem vivido.”
Dalai Lama

“O coração do homem planeja o seu caminho, mas o Criador Ihe dirige os passos.”
(Provérbios 16:9)

LISTA DE ABREVIATÓES

°C: graus Célsius

µm²: micrômetro quadrado

ANOVA: Análise de variância

AT: átrios

ATP: adenosina trifosfato

cDNA: DNA complementar

COBEA: Colégio brasileiro de experimentação animal

DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica

Foxo1: fork head box protein O1

g: Gramas

HAP: Hipertensão arterial pulmonar

HE: Hematoxilina e eosina

h: horas

IAM: Infarto agudo do miocárdio

IC: Insuficiência cardíaca

kDa: quilodalton

km/h: quilômetro por hora

LL: Limiar de lactato

Mcat: malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase

MEF2: myocyte enhancer factor2

mg/kg: miligrama por quilo

MHz: megahertz

min: minutos

mmol/L: milimol por litro

ms: milissegundo

N-CoR: nuclear receptor corepressor

NaCl 9%: solução salina

PNR: purine-rich negative regulatory

RM: repetição máxima

RNAm: RNA mensageiro

RT-qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real pós transcrição reversa

S: Grupo Sedentário Controle

SHAP: Grupo Sedentário Hipertensão Arterial Pulmonar

SRF: fator de resposta do soro

T: Grupo Treino Controle

T3: Triiodotironina

THAP: Grupo Treino Hipertensão Arterial Pulmonar

TR: hormônio da tireoide

VD: Ventrículo direito

VE: Ventrículo esquerdo

vs: versus

RESUMO

Avaliação do Colágeno e das Miosinas Cardíacas em Ratos com Hipertensão Arterial Pulmonar Submetidos a Treinamento Preventivo

O objetivo deste estudo foi investigar na fase inicial (pré-clínica) da Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP) o efeito do treino aeróbio preventivo no colágeno e nas miosinas cardíacas. Foram utilizados 32 ratos Wistar machos, separados em 4 grupos de 8 animais, grupo 1: sedentário controle (S); grupo 2: treino controle (T); grupo 3: sedentário Hipertensão Arterial Pulmonar (SHAP); grupo 4: treino Hipertensão Arterial Pulmonar (THAP). Os animais treinaram por treze semanas em esteira rolante, com duas semanas de adaptação com duração de 15 minutos à 45 minutos e velocidade da esteira de 0,6 km/h à 0,9 km/h, já no treinamento o tempo aumentou para 60 minutos e a velocidade para 1,1 km/h. A HAP foi induzida por aplicação da monocrotalina, com consequente disfunção ventricular direita após a décima semana de treinamento, e os animais controles foram submetidos a aplicação de solução salina. Foram realizados dois testes do limiar do lactato, 24 horas e 14 dias, após a aplicação da monocrotalina. Ao final da décima terceira semana foi realizado o ecocardiograma para comprovar a disfunção cardíaca. Esses animais foram posteriormente eutanasiados, e o ventrículo direito (VD) retirado para análises morfológica e de expressão gênica. O VD foi analisado por meio da coloração de cortes histológicos por Picrosirius red para o conteúdo de colágeno, e por PCR quantitativa após transcrição reversa (RT-qPCR em tempo real), para a expressão gênica de col1a1 (collagen type I alpha 1 chain), col1a2 (collagen type I alpha 2 chain), myh6 (myosin heavy chain 6) e myh7 (myosin heavy chain 7). Houve disfunção cardíaca comprovada pela redução da velocidade máxima da artéria pulmonar e do tempo de aceleração da artéria pulmonar. Os resultados não mostraram diferença em relação à fração de colágeno intersticial. Houve aumento dos genes col1a1 ($p=0,008$) entre os grupos SHAP e THAP vs. S, THAP vs T, e myh7 ($p=0,0242$) entre os grupos THAP vs S. Concluímos que no início da disfunção cardíaca por HAP já ocorre aumento dos genes myh7 e col1a1 sem aumento da fração de colágeno, porém o treinamento preventivo não amenizou essas alterações gênicas.

Palavras-chave: Hipertensão Pulmonar; Monocrotalina; Exercício, Disfunção Ventricular.

ABSTRACT

Evaluation of Collagen and Cardiac Myosin in Rats with Pulmonary Arterial Hypertension Submitted to Preventive Training

The purpose of this study was to investigate the effect of preventive aerobic training on collagen and cardiac myosin in the early phase (preclinical) of Pulmonary Arterial Hypertension (PAH). Thirty-two male Wistar rats were used, divided into 4 groups of 8 animals, group 1: sedentary control (S); Group 2: training control (T); Group 3: sedentary Pulmonary Arterial Hypertension (SPAH); Group 4: training Pulmonary Arterial Hypertension (TPAH). The animals trained for thirteen weeks on a treadmill, with two weeks of adaptation lasting from 15 minutes to 45 minutes and speed of the treadmill from 0.6 km / h to 0.9 km / h, while in training the time increased to 60 Minutes and the speed to 1.1km / h. PAH was induced by the application of monocrotaline, with consequent right ventricular dysfunction after the tenth week of training, and the control animals were submitted to saline solution. Two tests of the lactate threshold were performed, 24 hours and 14 days, after the application of monocrotaline. At the end of the thirteenth week, an echocardiogram was performed to confirm cardiac dysfunction. These animals were later euthanized, and the right ventricle (RV) removed for morphological and gene expression analyzes. The RV was analyzed by staining of Picrosirius red histological sections for collagen content and by quantitative PCR after reverse transcription (RT-qPCR in real time) for the gene expression of col1a1 (collagen type I alpha 1 chain), Col1a2 (collagen type I alpha 2 chain), myh6 (myosin heavy chain 6) and myh7 (myosin heavy chain 7). There was confirmed cardiac dysfunction by the reduction of the maximum velocity of the pulmonary artery and the time of acceleration of the pulmonary artery. The results showed no difference in relation to the fraction of interstitial collagen. There was an increase of the col1a1 genes ($p = 0.008$) between the SPAH and TPAH groups. S, TPAH vs T, and myh7 ($p = 0.0242$) between the TPAH vs S groups. We conclude that at the beginning of the cardiac dysfunction by PAH increases myh7 and col1a1 genes without increasing the collagen fraction, but preventive training did not soften these gene alterations.

Keywords: Hypertension, Pulmonary; Monocrotaline; Exercise, Ventricular Dysfunction.

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	12
	ANEXO 1 COMPROVANTE DE SUBMISSÃO NA REVISTA EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY.....	43
	ANEXO 2 - APROVAÇÃO ÉTICA.....	44

1 ARTIGO CIENTÍFICO

DISFUNÇÃO CARDÍACA POR HIPERTENSÃO PULMONAR CAUSA ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DOS GENES *MYH7* E *COL1A1* NÃO REVERSÍVEIS PELO TREINAMENTO PREVENTIVO

Thaoan Bruno Mariano¹, Ana Karenina Dias de Almeida Sabela¹, André Casanova de Oliveira¹, Robson Francisco Carvalho⁴, Dijon Henrique Salomé Santos³, Luis Antonio Justulin Junior⁴, Antonio Carlos Cicogna³, Katashi Okoshi³, Francis Lopes Pacagnelli^{1,5}.

¹Programa de pós-graduação em ciência animal, UNOESTE, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil,

²Faculdade de fisioterapia, UNOESTE, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil,

³Departamento de medicina clínica, faculdade de medicina, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil,

⁴Departamento de morfologia do instituto de biociência, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil,

⁵Departamento de fisioterapia, UNOESTE, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil,

Autor Correspondente: Francis Lopes Pacagnelli (*)

* Departamento de Fisioterapia, UNOESTE, Rua José Bongiovani, 700, Cidade Universitária, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. Tel: +55 (18) 91434973, Fax: +55 (18) 3229-1000. Email: francispacagnelli@unoeste.br

Título curto: Treino preventivo e disfunção cardíaca em ratos

Descritores: Disfunção Cardíaca, Hipertensão Pulmonar Arterial, Monocrotalina, Exercícios Preventivos.

O número total de palavras no artigo: 5000

O número total de referências: 62

Área Temática: Cardiologia e Reabilitação

Qual é a questão central deste estudo?

Nós investigamos o efeito do treinamento preventivo sobre a expressão gênica de *myh6* e *myh7* e de *colla1* e *colla2* cardíaco, no estágio de disfunção cardíaca na Hipertensão Pulmonar.

Qual é a principal conclusão e sua importância?

Nós fornecemos novos achados que na disfunção cardíaca por Hipertensão Pulmonar houve aumento na expressão gênica de *myh7* e *colla1*, mas o treinamento físico aeróbio preventivo não amenizou essas alterações. Esse achado tem importantes implicações clínicas para os pacientes no estágio inicial de Hipertensão Pulmonar, pois esta população pode ter alterações da função cardíaca.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar na fase inicial (pré-clínica) da Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP) o efeito do treino aeróbio preventivo no colágeno e nas miosinas cardíacas. Foram utilizados 32 ratos Wistar machos, separados em 4 grupos de 8 animais, grupo 1: sedentário controle (S); grupo 2: treino controle (T); grupo 3: sedentário Hipertensão Arterial Pulmonar (SHAP); grupo 4: treino Hipertensão Arterial Pulmonar (THAP). Os animais treinaram por treze semanas em esteira rolante, com duas semanas de adaptação com duração de 15 minutos à 45 minutos e velocidade da esteira de 0,6 km/h à 0,9 km/h, já no treinamento o tempo aumentou para 60 minutos e a velocidade para 1,1km/h. A HAP foi induzida por aplicação da monocrotalina, com consequente disfunção ventricular direita após a décima semana de treinamento, e os animais controles foram submetidos a aplicação de solução salina. Foram realizados dois testes do limiar do lactato, 24 horas e 14 dias, após a aplicação da monocrotalina. Ao final da décima terceira semana foi realizado o ecocardiograma para comprovar a disfunção cardíaca. Esses animais foram posteriormente eutanasiados, e o ventrículo

direito (VD) retirado para análises morfológica e de expressão gênica. O VD foi analisado por meio da coloração de cortes histológicos por Picrosirius red para o conteúdo de colágeno, e por PCR quantitativa após transcrição reversa (RT-qPCR em tempo real), para a expressão gênica de *colla1* (*collagen type I alpha 1 chain*), *colla2* (*collagen type I alpha 2 chain*), *myh6* (*myosin heavy chain 6*) e *myh7* (*myosin heavy chain 7*). Houve disfunção cardíaca comprovada pela redução da velocidade máxima da artéria pulmonar e do tempo de aceleração da artéria pulmonar. Os resultados não mostraram diferença em relação à fração de colágeno intersticial. Houve aumento dos genes *colla1* ($p=0,008$) entre os grupos SHAP e THAP vs. S, THAP vs T, e *myh7* ($p=0,0242$) entre os grupos THAP vs S. Concluimos que no início da disfunção cardíaca por HAP já ocorre aumento dos genes *myh7* e *colla1* sem aumento da fração de colágeno, porém o treinamento preventivo não amenizou essas alterações gênicas.

INTRODUÇÃO

A Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP) é uma doença grave e incapacitante, que ocasiona insuficiência cardíaca (IC) direita, cuja prevalência segundo dados europeus é de 15-60 casos por milhão de habitantes e de 5-10 casos/milhão/ano (Bocchi *et al.* 2012). Uma das principais causas da HAP é a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (Heck *et al.* 2015). Em estudo do nosso laboratório demonstramos que já fase inicial da HAP com disfunção cardíaca caracterizada por hipertrofia de ventrículo direito e diminuição da contratilidade houve a redução nos genes de trânsito de cálcio. Entretanto, a compreensão de outros mecanismos moleculares na fase inicial da HAP são necessários para que sejam traçadas novas e precoces estratégias terapêuticas (Pacagnelli *et al.* 2016).

Em pacientes o aumento da pressão pulmonar pode levar ao Cor Pulmonale como consequência (Miniati *et al.* 2011). O Cor Pulmonale é a hipertrofia concêntrica do ventrículo direito (VD) por sobrecarga de pressão, devido a pós-carga no VD estar aumentada (Han *et al.* 2007). Na América do Norte 50% dos casos de Cor Pulmonale estão relacionados à pacientes com DPOC (Loscalzo, 2013). Outras patologias que podem levar à hipertensão pulmonar e/ou ao Cor Pulmonale são o tromboembolismo pulmonar, fibrose cística, hipertensão pulmonar primária, fibrose pleural, entre outras (Ota *et al.* 1998). Devido a remodelação cardíaca patológica no Cor Pulmonale, o paciente pode ter alterações hemodinâmicas (Okada *et al.* 2009), e quando o organismo não consegue compensar a sobrecarga, se dá início à insuficiência cardíaca (IC) (Norton *et al.* 2002). O paciente com IC direita apresenta congestão venosa sistêmica, estase jugular bilateral, edema periférico, hepatomegalia, ascite, fadiga e intolerância ao exercício físico, devido ao ventrículo direito não ejetar o sangue de maneira satisfatória, permitindo o refluxo de sangue para o sistema (Bocchi *et al.* 2012).

Um dos possíveis mecanismos envolvidos na disfunção cardíaca na HAP são alterações nos genes relacionados a miosina e colágeno. Em estudo utilizando a monocrotalina, mas na fase de insuficiência cardíaca em miócitos isolados do ventrículo direito demonstraram redução na atividade ATPásica na cabeça da miosina, devido as alterações das isoenzimas das cadeias pesadas das miosinas para o sentido mais lento V1 ($\alpha\alpha$) > V2 ($\alpha\beta$) > V3 ($\beta\beta$). Essas alterações nas cadeias pesadas de miosinas são muito importantes uma vez que são as principais proteínas contráteis do coração e sua alteração pode ocasionar diretamente a diminuição da contratilidade miocárdica (Vescovo *et al.* 1989).

Em outros dois estudos que também utilizaram a monocrotalina como modelo de indução da IC direita, além do aumento da expressão da miosina com menor capacidade ATPásica V3 ($\beta\beta$), houve aumento da expressão do colágeno do tipo III e V, e redução do colágeno tipo I (Ishikawa *et al.* 1991; Morioka *et al.* 1992). Assim como as miosinas, o colágeno também exerce um papel fundamental na contração cardíaca, pois forma uma rede que sustenta todas as estruturas e auxilia na função sistólica e diastólica, regula a distensibilidade cardíaca, resiste a deformações patológicas e mantem o alinhamento dos cardiomiócitos e da matriz extracelular (Swynghedauw 1999; Zornoff *et al.* 2009).

Uma das condutas amplamente utilizadas para controlar e limitar os danos cardíacos é o exercício físico, o qual promove alterações na remodelação cardíaca e traz benefícios quando utilizado em humanos e modelos animais de hipertrofia do VD, por alterar as proteínas envolvidas na contração muscular (Colombo *et al.* 2013; Zile *et al.* 2015). O exercício preventivo promove efeito cardioprotetor na HAP, pois melhora a função do VD e ameniza a evolução do processo de remodelamento cardíaco patológico (Nogueira-Ferreira *et al.* 2016, Pacagnelli *et al.* 2016). Alguns mecanismos moleculares foram explorados para avaliar a melhora funcional cardíaca com o treinamento

preventivo, dentre eles o trânsito de cálcio e a regulação de citocinas da superfamília TNF, entretanto, a avaliação da expressão para os genes das cadeias pesadas de miosina α -MHC (gene *myh6*) e β -MHC (gene *myh7*) e colágenos do tipo 1 (gene *colla1*) e (gene *colla2*) nessa condição não tem sido explorados.

Devido os pacientes com disfunção cardíaca por HAP evoluírem para IC, e isso ser um problema de saúde pública, pelo índice de óbito e internações por complicações ser elevado, torna-se importante verificar os mecanismos moleculares do treinamento preventivo na disfunção do ventrículo direito, fase inicial da doença e que antecede a IC direita. A hipótese desse estudo é que o treino aeróbio prévio amenize as alterações gênicas na fase pre-clínica de disfunção ventricular, nos ratos com HAP induzida pela monocrotalina, aumentando a expressão da *myh6* e reduzindo a expressão de *myh7*, *colla1* e *colla2*. O objetivo do estudo foi investigar a influencia do treinamento aeróbio preventivo em ratos com disfunção ventricular direita na expressão gênica de cadeias pesadas de miosinas *myh6* e *myh7* e dos colágenos cardíaco *colla1* e *colla2*.

METODOLOGIA

Aprovação Ética

Os protocolos experimentais que foram utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil (Protocolo número: 2483 e 2484). Os animais receberam cuidados de acordo com os "Princípios de Cuidados com Animais de Laboratório" formulados pela Sociedade Nacional de Pesquisas Médicas e o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, elaborado pelo Instituto de Pesquisa em Animais de Laboratório (2011) e publicado pelo Instituto Nacionais de Saúde (NIH Publication, revised 2011). Os investigadores compreendem os princípios éticos sob os

quais a revista *Experimental Physiology* opera, e este estudo está em conformidade com a lista de verificação de ética animal da revista (Grundy, 2015).

Desenho Experimental

Os animais foram divididos em 4 grupos de 8 ratos cada: grupo 1: sedentário controle (S); grupo 2: treino controle (T); grupo 3: sedentário Hipertensão Arterial Pulmonar (SHAP); grupo 4: treino Hipertensão Arterial Pulmonar (THAP).

Os animais nos grupos T e THAP foram submetidos a um protocolo de treinamento aeróbio em esteira rolante por 13 semanas com uma frequência de 5 dias por semana. Os animais foram submetidos a duas semanas de adaptação e onze semanas de treinamento (Machado *et al.* 2006; Pacagnelli *et al.* 2016 *b*).

No início da 11^a semana, nos animais do grupo S e T receberam solução salina de Na⁺Cl⁻ a 0,9% intraperitoneal, para que todos fossem submetidos ao mesmo estresse devido administração de injeção (Colombo *et al.* 2013). A HAP foi induzida nos animais experimentais nos grupos SHAP e THAP. Foi injetada uma única dose intraperitoneal de monocrotalina de 60mg/kg (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) (Vescovo *et al.* 1998; Pacagnelli *et al.* 2016 *b*). Um dia após a administração da monocrotalina, os animais dos grupos T e THAP continuaram o treinamento aeróbio por mais 3 semanas (Souza-Rabbo *et al.* 2008; Colombo *et al.* 2013; Pacagnelli *et al.* 2016).

Para ajuste da carga e continuidade do treinamento, os animais foram submetidos teste para análise de limiar de lactato (Carvalho *et al.* 2005; Pacagnelli *et al.* 2016 *b*). Duas semanas após completar o protocolo de treino, foi realizada uma avaliação ecocardiográfica que identificou disfunção ventricular direita. Após o exame ecocardiográfico, os animais foram pesados e, em seguida, eutanaziados com uma dose intraperitoneal de pentobarbital de sódio (50 mg kg⁻¹, I.P., fornecido pelo Dr. Juliano Rodrigues Pacagnelli, Médico Veterinário, Santo Anastácio, São Paulo, Brasil) e mortos

por decapitação realizada por uma pessoa experiente, o que é o caso dos autores do presente estudo (Souza *et al.* 2014; Pacagnelli *et al.* 2016 *a*; Pacagnelli *et al.* 2016 *b*). O coração foi removido, dissecado e átrios e ventrículos separados e pesados. O ventrículo direito foi posteriormente utilizado para análise do conteúdo de colágeno pela técnica de Picrosirius, e para a expressão gênica de cadeias pesadas de miosinas e colágeno, pela técnica de RT-qPCR.

Animais e procedimentos

Nesse estudo, foram utilizados 32 (trinta e dois) ratos Wistar, machos, adultos, com três meses de idade (120 dias), peso corporal entre 140 ± 20 g, provenientes do biotério central da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) Presidente Prudente-São Paulo. Os animais foram alocados em caixas plásticas com dimensão 41 x 34 x 16 cm, com 3 animais, temperatura de 21 a 23°C e com ciclos de luminosidade de 12h. Os ratos receberam ração (contendo 26% proteína, 3% lipídio, 54% carboidrato e 17% outros) (Alisul; Supralab, Sao Leopoldo/RS, Brasil) de modo controlado e água *ad libitum*.

Controle de alimentação

Como a monocrotalina reduz a ingestão de alimentos (Lopes *et al.* 2008), para controle desse efeito, os animais foram separados em gaiolas individuais para dosar o consumo diário de ração. Os ratos tratados com monocrotalina (grupos SHAP e THAP) foram permitidos comer livremente. Nos grupos S e T, os ratos foram adaptados à dieta aos ratos tratados por monocrotalina, permitindo-lhes apenas a quantidade de alimentos consumidos do dia anterior pelos ratos tratados. O controle de alimentação foi realizado após a administração de monocrotalina, devido os animais iniciarem a remodelação patológica do VD, diminuindo o consumo de ração (Lopes *et al.* 2008; Pacagnelli *et al.* 2016 *b*).

Treinamento

Os animais dos grupos T e THAP foram submetidos a um protocolo de treinamento aeróbico realizado em esteira adaptada (modelo TK 1, IMBRAMED) que consistiu em 13 semanas de treinamento, sendo 2 semanas de adaptação (pré-treinamento), 8 semanas de treinamento antes da aplicação da monocrotalina e 3 semanas após a injeção de monocrotalina. O treinamento foi realizado 5 dias na semana. O período de pré-treinamento (adaptação) teve início com 15 minutos a 0,6 km/h na primeira semana, com aumento gradual até o fim da segunda semana do tempo para 30 e 45 minutos, e da velocidade 0,7 0,8 até 0,9km/h. Na terceira semana o treinamento foi a 0,9 km/h durante 45 minutos e aumentou para 60 minutos com a mesma velocidade na quarta e quinta semana. Na sexta, sétima e oitava semanas o tempo continuou de 60 minutos, e a velocidade foi aumentada para 1,0km/h, na nona e décima semana a velocidade foi para 1,1km/h (Rodrigues et al. 2007). Na décima semana foi aplicada a monocrotalina e a solução salina nos animais. Foi realizado teste do limiar do lactato, sendo um teste 24 horas após a aplicação, para determinar a velocidade (0,9km/h T, 0,8km/h THAP) em que os ratos deveriam treinar por 60 minutos, e após 2 semanas treinando foi realizado o teste novamente e os ratos de ambos os grupos treinaram a 0,9km/h por 60 minutos mais uma semana.

Limiar de lactato

Para determinar a velocidade de treino dos animais o lactato foi dosado. Os animais nos grupos T e THAP foram submetidos a um teste de esforço incremental. O protocolo utilizado foi adaptado do descrito por Carvalho *et al.* (2005) e foi realizado 24 horas após a administração de monocrotalina e no início das 11^a, 12^a e 13^a semanas, para ajustar a velocidade de treino (Pacagnelli *et al.* 2016 *b*). O teste começou com um aquecimento a 0,5 km / h, seguido por 5 minutos de repouso. Depois disto, a velocidade

foi aumentada para 0,7 km / h durante 3 min com aumento de 0,2 km / h a cada 3 min com uma inclinação de 0%, até o lactato atingir a variação de 1mmol / l em comparação com o valor, ou até à exaustão (Svedah & Macintosh 2003). A exaustão foi definida como o momento que os ratos não puderam continuar a correr durante 3 min. Depois de cada carga aumentada, os animais foram removidos manualmente do treinamento por 1 min para o sangue ser coletado. Amostras de sangue foram colhidas da cauda do animal utilizando um lactímetro Accutrend Plus (Roche, San Cugatdel Vall Es, Barcelona, Espanha). O aparelho foi calibrado de acordo com as especificações do fabricante. O cálculo para estipular a velocidade máxima foi realizado usando um método de média aritmética de todas as velocidades de cada grupo experimental, até limiar de lactato ou exaustão (Souza *et al.* 2014). O limiar de lactato foi definido como a velocidade de rotação que poderia ser mantida sem aumento do lactato de 1,0 mmol / l acima da concentração de lactato no sangue (Ferreira *et al.* 2007, Pacagnelli *et al.* 2016 b).

Avaliação ecocardiográfica

A avaliação ecocardiográfica foi realizada utilizando o Ecocardiograma (General Electric Medical Sistemas, Vivid S6, TiratCarmel, Israel) equipados com sonda multifrequência de 5-11,5 MHz. Os ratos foram anestesiados por ketamina (50mg kg⁻¹; Dopalen®) e xilazina (0.5 mg kg⁻¹; Anasedan®) intraperitoneal. O fluxo da artéria pulmonar foi obtido por doppler, e o tempo da velocidade máxima de fluxo [velocidade Tempo de aceleração (PVAT)], tempo de ejeção pulmonar (PET) e velocidade de fluxo de pico (PFV) foram medidos (Martinez *et al.* 2011; Eguchi *et al.* 2014; Pacagnelli *et al.* 2016 b). O tempo de aceleração da velocidade pulmonar é um indicador da gravidade da hipertensão pulmonar, e quanto maior o nível de pressão arterial sistólica pulmonar, menor o valor de PVAT. O tempo de ejeção pulmonar é um parâmetro relacionado à função sistólica e ao grau de HAP. A velocidade máxima do

fluxo está relacionada com a função sistólica do VD (Dabestani *et al.* 1987; Pacagnelli *et al.* 2014; Pacagnelli *et al.* 2016 b).

Análise histológica

O ventrículo direito foi dividido em duas partes, uma das partes foi fixada em solução de formol tamponado a 10% por um período de 48 horas e a outra utilizada para análise da expressão gênica. Após fixação, o tecido foi incluso em blocos de parafina, obtendo-se a seguir cortes histológicos coronais utilizando-se micrótomo Leica (RM 2155). Os cortes histológicos foram corados em lâminas histológicas pela técnica de Picrosirius, para visualização do colágeno, foram feitas para avaliação do interstício do miocárdio do VD. As imagens do tecido cardíaco foram capturadas por computador acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais obtidas a partir do microscópio LEICA DM LS (modelo DM750, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) ao computador dotado de programa de análise de imagens Image Pró-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA), que pinta a coloração vermelha do colágeno (Picrosirius) em azul e da a porcentagem do colágeno em relação à área total da imagem. Foram analisados vinte campos de cada ventrículo direito, utilizando objetiva de 40X com aumento de 400x. Os campos escolhidos estavam afastados da região perivascular (Zornoff *et al.* 2006).

Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real após transcrição reversa (RT-qPCR)

O RNA total foi extraído do tecido do VD utilizando TRIzol (ThermoScientific, EUA) e, depois tratados com DNase deoxyribonuclease I (ThermoScientific, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose, para visualização dos RNAs ribossomais. O (High Capacity Reverse

Transcriptional Kit (ThermoScientific, EUA) foi utilizado para a síntese de RNA complementar (cDNA) a partir de 1000 ng de RNA total, para cada amostra. Esse cDNA foi utilizado para avaliar os níveis relativos de *Rattus norvegicus collagen type I alpha 1 chain (colla1)* mRNA, *Rattus norvegicus collagen type I alpha 2 chain (colla2)* mRNA, *Rattus norvegicus myosin heavy chain 6 (myh6)* mRNA e *Rattus norvegicus myosin heavy chain 7 (myh7)* mRNA utilizando

PCR quantitativa em tempo real (qPCR). A qPCR foi realizada utilizando-se o kit universal mastermix II (AppliedBiosystems™, EUA), no sistema StepOne Plus (ThermoScientific,EUA). Todas as amostras foram analisadas em duplicatas. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50 ° C durante 2 min; 95 ° C por 10 min; seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 ° C, durante 15 s; e extensão final de 60 ° C, durante 1 min. A expressão gênica foi quantificada em relação aos valores do grupo S, após normalização pelo níveis de expressão do gene de referência beta-actina (Actb, Rn00667869_m1), utilizando-se método 2^{-DDCt} (Livak & Schmittgen 2001). As sequencias de iniciadores (Tabela 1) foram selecionadas a partir dos números de acesso dos transcritos no GenBank (<http://pubmed.com>) e desenhados utilizando-se o software Primer Express v3.0 (ThermoScientific, EUA).

Sigla	Nome	Genebank
<i>colla1</i>	collagetype I alpha 1 chain	NM_053304.1
<i>colla2</i>	collagetype I alpha 2 chain	<u>NM_053356.1</u>
<i>myh6</i>	myosin heavy chain 6	<u>NM_017239.2</u>
<i>myh7</i>	myosin heavy chain 7	<u>NM_017240.2</u>
<i>actb</i>	actin, beta	NM_031144.3

Análise dos Dados

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Para avaliar a normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Para analisar a fração intersticial do colágeno e a expressão de mRNA de *colla1* e *myh6* foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunns, e para a expressão de mRNA de *colla2* e *myh7* a ANOVA seguido do pós teste de Tukey. Os dados foram expressos como gráfico box plot mostrando primeiro e terceiro quartil, mediana, mínimo e máximo. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Avaliação ecocardiográfica

Os dados já publicados por Pacagnelli *et al.* (2016 *b*), mostram que os animais tratados com monocrotalina apresentam disfunção do VD, devido a diminuição em 23% da velocidade máxima da artéria pulmonar (S vs. SHAP, $p = 0,001$) e diminuição de 30% do tempo de aceleração da artéria pulmonar (S vs. SHAP, $p = 0,005$). E comprovaram que o treino prévio aumentou em 28% a velocidade máxima da artéria pulmonar (SHAP vs. THAP, $p = 0,001$).

Análise histológica

Os resultados da fração de colágeno intersticial na lamina de Picrosirius estão representados nas figuras 1 e 2 apresentados em boxplot e por imagem da lâmina respectivamente. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) na porcentagem de colágeno no interstício cardíaco entre os grupos.

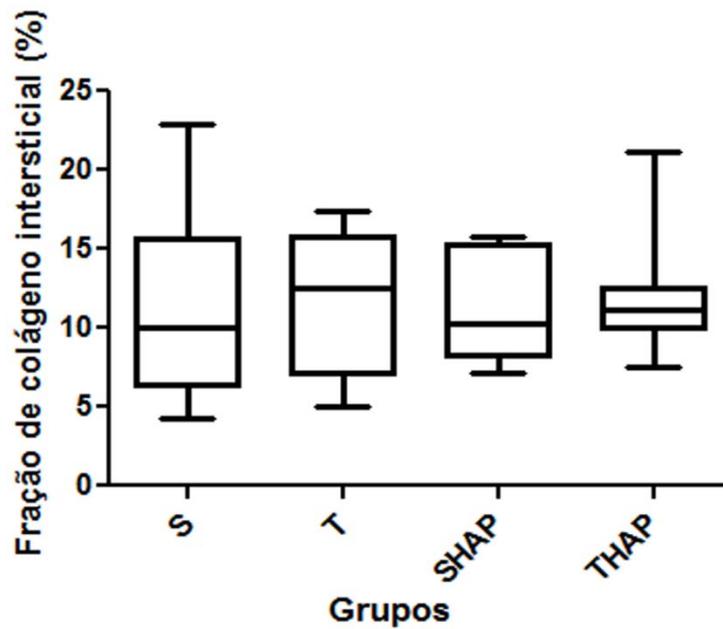


Figura 1. Efeito do treinamento preventivo na fração de colágeno intersticial cardíaco na HAP. Análise das lâminas do miocárdio, coradas pela técnica de Picrosirius Red, quantificadas através do programa Image Pro-Plus. Os grupos experimentais são: S (8): Sedentário Controle; T (8): Treino Controle; SHAP (8): Sedentário Arterial Hipertensão Pulmonar; THAP (8): Treino Hipertensão Arterial Pulmonar.

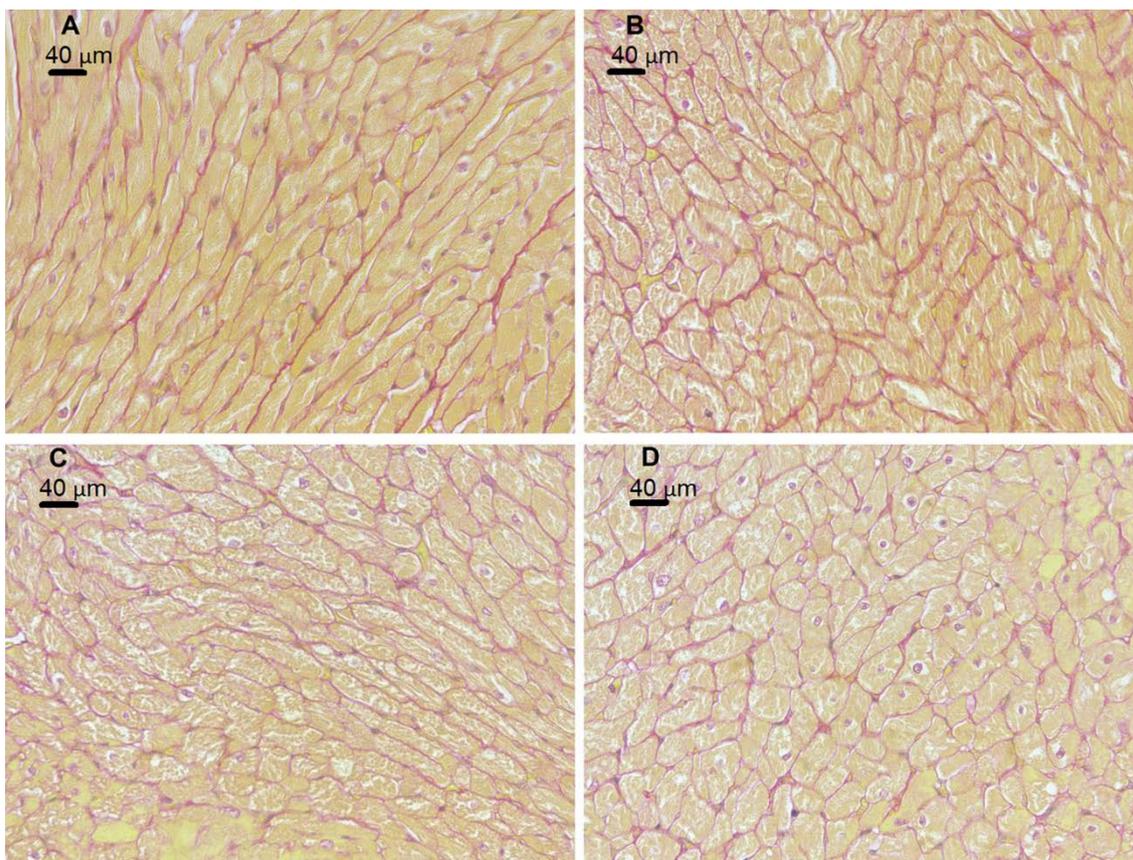


Figura 2. Laminas para análise da fração de colágeno intersticial cardíaco na HAP. Foram realizadas secções transversais do músculo cardíaco coradas pela técnica de Picrosirius Red e visualizadas com objetiva de 40x com aumento de 400x. A. (n=8): Sedentário Controle; B. (n=8): Treino Controle; C. (n=8): Sedentário Hipertensão Arterial Pulmonar; D (n=8): Treino Hipertensão Arterial Pulmonar.

Expressão gênica relativa das miosinas e do colágeno

Os resultados da expressão gênica para miosinas e colágeno estão apresentados na figura 3. A expressão do gene *myh7* foi maior no grupo THAP em relação ao controle (S vs. THAP, $p=0,0242$). A expressão do *coll1a1* se apresentou maior nos grupos com HAP em relação ao sedentário e ao treinado (S vs SHAP, S vs THAP, T vs THAP, $p=0,0008$). Os demais grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

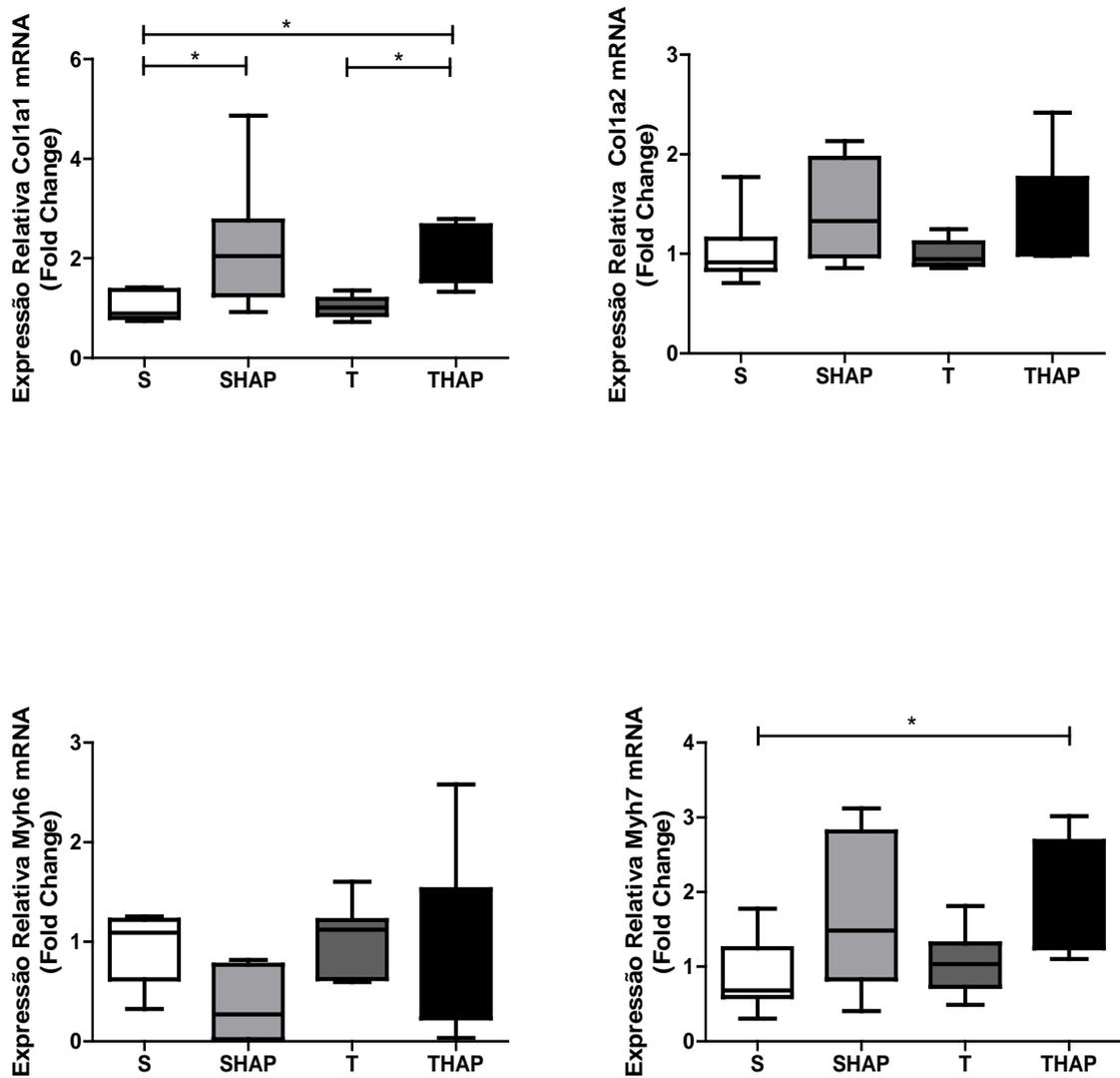


Figura 3. Expressão gênica do músculo cardíaco nos grupos experimentais. Genes *colla1* e *colla2*: Genes do colágeno tipo 1; *myh6* e *myh7*: Genes das miosinas α e β respectivamente, analisados pela técnica de PCR em tempo real. S (8): Sedentário Controle; T (8): Treino Controle; SHAP (8): Sedentário Arterial Hipertensão Pulmonar; THAP (8): Treino Hipertensão Arterial Pulmonar. *Diferença estatística $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

O principal achado deste estudo foi que na fase inicial (pré-clínica) de disfunção cardíaca por HAP já ocorreu aumento na expressão gênica de *myh7* e *colla1*; entretanto, o treinamento físico prévio não foi capaz de atenuar essas alterações. Para o nosso conhecimento este é o primeiro estudo a identificar precocemente esta alteração na expressão desses genes. Embora o treino não tenha revertido as alterações na expressão gênica de *myh7* e *colla1*, houve o efeito cardioprotetor deste comprovado pela melhora da função cardíaca apresentada pelo ecocardiograma (Pacagnelli *et al.* 2016 *b*).

As miosinas são as principais proteínas contráteis do músculo, sendo que no coração existem cadeias pesadas de miosinas (α -MHC e β -MHC), miosina regulatória de cadeia leve, miosina essencial de cadeia leve e miosina ligada a proteína C (Marsigla *et al.* 2014; Zornoff *et al.* 2009). A α -MHC tem de duas a três vezes maior atividade de ATPase e maior velocidade de deslizamento que a β -MHC, mas a β -MHC pode gerar força com menor gasto energético (Cai *et al.* 2010). Essas proteínas contráteis se diferem em relação a capacidade do sitio de ligação com a adenosina trifosfato, enquanto a α -MHC possuem isoenzimas V1 com maior capacidade de ligação, sendo mais rápida a β -MHC possui isoenzima V3 com menor capacidade, então de forma decrescente de $\alpha\alpha$ V1 > $\alpha\beta$ V2 > $\beta\beta$ V3 (Swynghedauw 1999; Zornoff *et al.* 2009).

As MHC α e β estão alteradas na hipertrofia cardíaca e IC, com redução da α e aumento da β (Swynghedauw 1999) e, em nosso experimento, mesmo sem os animais apresentarem IC, já detectamos aumento da expressão gênica de *myh7* (gene responsável pelo aumento da β -MHC) nos ratos com HAP submetidos ao treinamento. Essa alteração precoce no gene *myh7* pode estar relacionada com a disfunção contrátil apresentada no VD. Dentre os mecanismos que possam explicar essa alteração na HAP esta o eixo sinalizatório TWEAK/NF- κ B, onde há o aumento de citocinas pro

inflamatórias, como TNF- α . O TNF- α regula a via do NF- κ B pelos mediadores p100/p52 e Rel-B promovendo piora da função cardíaca (Nogueira-Ferreira *et al.* 2016).

Os estudos de experimentação em ratos com modelo de IC e/ou hipertrofia cardíaca por estenose aórtica, mostraram redução nas α -MHC e aumento das β -MHC no VE (Agrisano *et al.* 2014). Estes achados também foram constatados em outra pesquisa com ratos em câmara hiperbárica que leva a hipóxia crônica e reduz a capacidade enzimática do miocárdio e a síntese de ATP, o que diminui o desempenho cardíaco na altitude, entretanto essas alterações das MHCs ocorreram em ambos os ventrículos (Cai *et al.* 2010). O que corrobora também com o estudo de Hydock *et al.* (2009) que administrou em ratos o medicamento doxorubicina, que causa cardiotoxicidade, com degeneração miocárdica progressiva e IC por disfunção ventricular sistólica, e demonstrou a mesma alteração nas MHC. Estes diferentes resultados podem estar associados ao estágio da doença, sendo que em uma fase inicial (disfunção cardíaca) há alterações, entretanto são mais amenas quando comparados com o quadro de IC.

Além dos mecanismos já citados, outras vias podem estar envolvidas na regulação das MHC cardíacas. Hormônios tireoidianos, interleucinas, catecolaminas, aumento do estímulo elétrico entre outros colaboram na disfunção cardíaca (Gupta *et al.* 2007; Giger *et al.* 2009; Iwaki *et al.* 2014). O hormônio da tireoide nos ventrículos aumenta a expressão de *myh6* e reprime *myh7*, mas não influencia a expressão gênica nos átrios e musculatura periférica, e é mediado por meio de uma proteína nuclear, receptor de hormônio da tireóide (TR), um produto de *c-erbA* proto-oncogene (Gupta *et al.* 2007). Houve alteração dos receptores dos hormônios da tireoide TR α 1, TR α 2 e TR β 1, em ratos quando imposto a sobrecarga de pressão por estenose da aorta, com redução da expressão do receptor nuclear de hormônio tireoidiano TR α 1 e aumento de TR α 2, o qual se relaciona com a redução da transcrição de *myh6* (Kinugawa *et al.* 2001). Entretanto, um estudo com células do músculo cardíaco de ratos neonatais

cultivadas em cultura teve como resultado a redução da β -MHC relacionada com a expressão de outro hormônio da tireóide – Triiodotironina T3 que realiza uma regulação negativa desta miosina (Iwaki *et al.* 2014).

Há outros mecanismos que se relacionam com a regulação dos genes das MHC que são os fatores de transcrição expressos de maneira precoce: *GATA transcription factor4*, *NK2 homeobox 5* (Nkx2-5- gene), *MADS-box transcription factor*, *serum response factor* (Srf) (atenua a expressão de *myh6* e *myh7*), *myocyte enhancer factor 2* (MEF2) e AT, fatores que se ligam a sequência *Mcat malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase*, e *forkhead box O1* (Foxo1). O Foxo1 pode atuar como repressor de *myh6* através de histona deacetilase ou supressor nuclear N-CoR (Qi *et al.* 2015). Um elemento rico em purina, *purine-rich negative regulatory* (PNR), presente na primeira região do gene *myh6*, quando aumentado reduz a expressão desta miosina de 20 a 30 vezes (Gupta *et al.* 2007; Giger *et al.* 2009).

Além das miosinas, há uma rede de colágeno cardíaco que sustenta e liga todas as estruturas, e que auxilia na adequada função cardíaca (sistólica e diastólica), devido exercer papel fundamental ao resistir a deformações patológicas, manter o alinhamento das estruturas e regular a distensibilidade cardíaca e a transmissão de força, durante o encurtamento da fibra cardíaca (Shoulders *et al.* 2009; Zornoff *et al.* 2009; Zile *et al.* 2015). Em nosso estudo, já na fase de disfunção cardíaca pela HAP, houve aumento do gene de *colla1*, o que demonstra precocemente a influência desse gene na piora da funcionalidade cardíaca.

Em situações patológicas como no infarto agudo do miocárdio e sobrecarga de pressão, o aumento da fibrose intersticial está diretamente relacionada à piora da função contrátil ventricular (Yang *et al.* 2013). Ainda nesse estudo, os autores utilizaram ecocardiograma para demonstrar piora da função contrátil, com aumento da espessura

do septo, da parede posterior do VE e da dimensão da câmara, os quais foram associados a fração de ejeção reduzida e pressão diastólica aumentada.

Nas diferentes formas de IC, por sobrecarga pressórica ou infarto, a expressão gênica de *coll1a1*, *coll1a2* e *col3a1* aumentam, porém eles diferem em quantidade em relação à causa da IC (Wang *et al.* 2014; Yang *et al.* 2015). Na sobrecarga de pressão, o aumento de colágeno tipo 1 promove maior rigidez cardíaca alterando primeiro a diástole e, posteriormente, a sístole, por não controlar mais o alinhamento das estruturas, regular a distensibilidade cardíaca e a transmissão de força (Shoulders *et al.* 2009; Zornoff *et al.* 2009; Zile *et al.* 2015).

Um dos mecanismos que alteram o colágeno cardíaco é aumentado na sobrecarga de pressão devido ao estresse mecânico ativar os fibroblastos e estes induzirem o início de processo inflamatório com concomitante aumento de matriz extracelular (Lindner *et al.* 2014). No modelo da HAP por monocrotalina, há uma sobrecarga de pressão por aumento da resistência vascular pulmonar, com ativação da via NF- κ B e essas alterações precocemente já podem ter ocasionado o aumento do gene *coll1a1*, como evidenciado no nosso estudo (Nogueira-Ferreira *et al.* 2016).

Foi demonstrado no modelo de ratos com constrição da aorta maior aumento do gene *coll1a1* que de *col3a1* (Wang *et al.* 2014). Já no infarto agudo do miocárdio, o gene *col3a1* aumentou mais que o *coll1a1*, conseqüente ao processo cicatrização do tecido cardíaco (Yang *et al.* 2015). Esses autores também demonstraram que ambos tipos de genes de colágeno podem ser atenuados por inibição pós transcricional realizada pelo microRNA *miR-29b*. Além disso, o treino aeróbio altera um conjunto de microRNAs associados com a melhora da função cardíaca (Souza *et al.* 2015). No nosso estudo houve aumento do gene *coll1a1*, mas o *coll1a2* não aumentou de maneira significativa.

Uma das condutas não farmacológicas utilizadas na HAP é o treinamento físico, realizado na reabilitação cardiopulmonar após a doença instalada, entretanto, a

implementação do treino como conduta preventiva na disfunção ventricular direita tem sido pouco abordada (Nogueira-Ferreira *et al.* 2016; Pacagnelli *et al.* 2016 *b*). No nosso estudo o treino preventivo realizado em esteira por 13 semanas, 5 dias por semana com duração de até 60 minutos e velocidade de até 1,1km não foi capaz de amenizar as alterações dos genes de *myh7* e de *colla1*. Entretanto, de acordo com os dados já publicados, melhorou a função cardíaca constatada pelo ecocardiograma (Pacagnelli *et al.* 2016 *b*). Outros mecanismos moleculares devem ser estudados para comprovar a melhora do treinamento na fase inicial de HAP.

Já foi demonstrado a influência benéfica de vários tipos de treinamentos nas miosinas e colágeno cardíaco. O treinamento aeróbio induz hipertrofia cardíaca fisiológica devido à carga de volume imposta ao coração sem período de repouso, a qual resulta no aumento biossíntese de componentes contráteis, incluindo a cadeia pesada de miosina rápida (α -MHC), diminuição da isoforma lenta (β -MHC) (Mcmullen *et al.* 2007).

Além do treinamento aeróbio, o treinamento físico resistido é capaz de normalizar a quantificação de miosinas α/β MHC em ratos espontaneamente hipertensos, mas com perda desta melhoria após 4 semanas sem realizar o treino (Carneiro-Júnior *et al.* 2013). Outro estudo apresentou resultados positivos aplicando o treino de natação em ratos, mas em câmara hiperbárica (Cai *et al.* 2010). Nesse estudo, os animais que treinaram apresentaram maior quantificação da α -MHC e menor da β -MHC, o que indicou melhor atividade contrátil do músculo cardíaco (Cai *et al.* 2010). Hydock *et al.* (2009) aplicou exercício em roda voluntário por 6 semanas em ratos, onde os animais permaneciam 24 h na gaiola, andavam em média 45 km por semana, e uma média de 4,3 km por dia. Esses autores verificaram um aumento na α -MHC e redução da β -MHC, o que demonstrou o efeito cardioprotetor do exercício físico. Entretanto, em

nossos achados, o treinamento prévio não amenizou o aumento de *myh7*. As modalidades do exercício, frequência, duração, intensidade, e fase da doença no qual o exercício foi implementado podem, portanto, ter ocasionado diferentes respostas na regulação das cadeias pesadas de miosinas cardíacas.

Em relação ao colágeno SOCI *et al.* (2011), demonstraram que em ratos saudáveis o treinamento de natação aumenta a expressão de miRNA-29c o que reduziu a expressão dos genes de colágeno cardíaco *colla1* e *col3a1*. Outro estudo com ratos que apresentavam alterações cardíacas devido ao envelhecimento, com treinamento em esteira por 12 semanas comprovou redução da fibrose e *colla2* (Kwak *et al.* 2011). Já no infarto agudo do miocárdio, o treinamento com ratos em esteira realizado com inclinação de 5° de forma moderada, durante 45 minutos, reduziu o *colla2* e *col3a1* (Xu *et al.* 2008). O treinamento físico de resistência 4 vezes por semana com 75% de 1RM e series de 10-12 e o treino em esteira 5 vezes por semana a 15m/min por 12 semanas, em animais com seis semanas após infarto agudo do miocárdio, melhorou a fração intersticial de colágeno, devido o efeito do exercício de reverter à hipertrofia patológica (Nunes *et al.* 2013; Alves *et al.* 2014). Porém, em nossos achados, os animais ainda não apresentavam aumento de colágeno no interstício, mas o aumento do gene *colla1* já pode indicar que posteriormente o colágeno seria aumentado, o que pode estar relacionado com a fase inicial da doença, de disfunção cardíaca.

Assim como nas miosinas, o colágeno pode ter sido influenciado pela modalidade do exercício, frequência, duração, intensidade, e fase da doença no qual o exercício foi implementado.

Concluimos que na fase inicial da HAP os animais já apresentam aumento na expressão do gene *myh7* e *colla1* sem aumento da fração de colágeno intersticial; porém, o treinamento físico preventivo não foi capaz de amenizar estas alterações.

Outros mecanismos, assim como variações na intensidade e tipo de exercício, devem ser investigados na fase pré-clínica da HAP.

REFERÊNCIAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4a ed, ed. New York, pp. 357-374. Garland Science.

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

Angrisano T, Schiattarella GG, Keller S, Pironti G & Florio E (2014). Epigenetic Switch at *Atp2a2* and *Myh7* Gene Promoters in Pressure Overload-Induced Heart Failure. *PLoS One* **9**, e106024.

Bocchi EA, Marcondes-braga FG, Bacal F, Ferraz AS, Albuquerque D & Rodrigues D (2012). Sociedade Brasileira de Cardiologia. Atualização da Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica - 2012. *Arq Bras Cardiol* **98**, 1-33

Carneiro-Júnior MA, Quintão-Júnior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, da Cunha DNQ, Amadeu MA, Felix LB, de Oliveira EM, Cruz JS, Prímola-Gomes TN, Mill JG, Natali AJ (2013) . The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. *J Mol Cell Cardiol* **57**:119–128.

Carvalho JF, Masuda MO & Pompeu FAMS (2005). Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **140**, 409–413.

Cai M, Huang Q, Liao W, Wu Z, Liu F & Gao Y (2010). Hypoxic training increases metabolic enzyme activity and composition of myosin heavy chain isoform in rat ventricular myocardium. *Eur J Appl Physiol* **108**, 105–111.

- Colombo R, Siqueira R, Becker CU, Fernandes TG, Pires KM, Valença SS, Souza-rabbo MP, Araujo AS & Belló-klein A (2013). Effects of exercise on monocrotaline-induced changes in right heart function and pulmonary artery remodeling in rats. *Can J Physiol Pharmacol* **91**, 38-44.
- Dabestani A, Mahan G, Gardin JM et al. (1987). Evaluation of pulmonary artery pressure and resistance by pulsed Doppler echocardiography. *Am J Cardiol* **59**, 662–668.
- Eguchi M, Ikeda S, Kusumoto S et al. (2014). Adipose-derived regenerative cell therapy inhibits the progression of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Life Sci* **118**, 306-312.
- Ferreira JCB, Rolim NPL, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E & Brum PC (2007). Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **34**, 760-765.
- Freimann S, Scheinowitz M, Yekutieli D, Feinberg MS, Eldar M & Kessler-icekson G (2005). Prior Exercise Training Improves the Outcome of Acute Myocardial Infarction in the Rat. *J Am Col Cardiol* **45**, 931-8.
- Giger JM, Bodell PW, Baldwin KM, Haddad F (2009). The CAAT-binding transcription factor 1/nuclear factor 1 binding site is important in β -myosin heavy chain antisense promoter regulation in rats. *Exp Physiol* **94**, 1163–1173.
- Grundy D (2015). Principles and standards for reporting animal experiments in *The Journal of Physiology and Experimental Physiology*. *Exp Physiol* **100**, 755–758.
- Gupta MP (2007). Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **43**, 388-403.
- Han MK, Mclaughlin VV, Criner GJ, Martinez FJ (2007). Pulmonary Diseases and the Heart. *Circul* **116**: 2992-3005.

Heck SA, Nguyen JC, Le DDA, Bals RB & Dinh QTA (2015). Pharmacological Therapy of Bronchial Asthma: The Role of Biologicals. *Int Arch Allergy Immunol* **168**, 241-252.

Ishikawa S, Honda M, Yamada S, Goto Y, Kuzuo H, Morioka S & Moriyama K (1991). Changes in contractile and noncontractile protein metabolisms in both ventricles in monocrotaline-treated rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **17**, 119-21.

Iwaki H, Sasaki S, Matsushita A, Ohba K, Matsunaga H, Misawa H1, Oki Y, Ishizuka K, Nakamura H & Suda T (2014). Essential role of TEA domain transcription factors in the negative regulation of the MYH7 gene by thyroid hormone and its receptors. *PLoS One* **29**, 88610.

Júnior JERH, Soares PM, Melo CL, Filho ACVA, Filho JGS, Filho JMB, Sousa FCF, Fonteles MMF, Leal LKA, Queiroz MGR & Vasconcelos SMM (2010). Atividade farmacológica da monocrotalina isolada de plantas do gênero *Crotalaria*. *Rev Bras Farmac* **20**, 453-458.

Junior RS, Neto VD, Gonçalves R, Botter M, Rivaben JH, Junior AOS, Frigini T & Scapolan MB (2008). Cirurgia torácica - Avaliação da qualidade de vida pré e pós-operatória em pacientes com dpc grave submetidos à pneumostomia. *J Bras Pneumol* **34**, 1-274.

Kinugawa K, Yonekura K, Ribeiro RCJ, Eto Y, Aoyagi T, Baxter JD, Camacho SA, Bristow MA, Long CS & Paul C (2001). Simpson Regulation of Thyroid Hormone Receptor Isoforms in Physiological and Pathological Cardiac Hypertrophy. *Circ Res* **89**, 591-598.

Kwak HB, Kim JH, Joshi K, Yeh A, Martinez DAn & Lawler JM (2011). Exercise training reduces fibrosis and matrix metalloproteinase dysregulation in the aging rat heart. *FASEB J* **25**, 1106-17.

Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Silva DC et al. (2013). Influence of long-term obesity on myocardial gene expression. *Arq Bras Cardiol* **100**, 22-237.

Lindner D, Zietsch C, Tank J, Sossalla S, Fluschnik N, Hinrichs S, Maier L, Poller W, Blankenberg S, Schultheiss H, Tschöpe C & Westermann D (2014). Cardiac fibroblasts support cardiac inflammation in heart failure. *Basic Res Cardiol* **109**, 428.

Livak KJ & Schmittgen KD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} method. *Methods* **25**, 402-408.

Lopes FS, Carvalho RF, Campos GE, Sugizaki MM, Padovani CR, Nogueira CR, Cicogna AC, Dal-Pai-Silva M (2008). Down-regulation of MyoD gene expression in rat diaphragm muscle with heart failure. *Int J Exp Pathol* **89**, 216-222.

Loscalzo J (2014). Medicina Cardiovascular de Harrison. AMGH Editora Ltda., A Grupo A Educação S.A. company. 2^a Edição pg. 153.

Machado FB, Gobatto CA, Contartese RVL, Papoti M & Mello AR (2006). The maximal lactate steady state is ergometerdependent in experimental model using rats. *Rev Bras Med Esporte* **12**, 259-262.

Machado FRP (2008). Pulmonary hypertension in chronic respiratory disorders: we need to learn more. *J Bras Pneumol* **34**, 65-66.

Marsiglia JDC & Pereira AC (2014). Cardiomiopatia Hipertrófica: Como as Mutações Levam à Doença? *Arq Bras Cardiol* **102**, 295-304.

Martinez ST, Santos APB & Pinto AC (2013). A Determinação Estrutural do Alcaloide Pirrolizidínico Monocrotalina: Exemplo dos Desafios da Química de Produtos Naturais Até os Anos Sessenta do Século XX. *Rev Virtual Quim* **5**, 300-311.

Mcmullen JR & Jennings GL (2007). Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **34**, 255–262.

Miniati M, Monti S, Basta G, Cocci F, Fornai E, Bottai M (2011). Soluble receptor for advanced glycation end products in COPD: relationship with emphysema and chronic cor pulmonale: a case-control study. *Resp Res* 12:37.

Morioka S, Honda M, Ishikawa S, Ishinaga Y, Yano S, Tanaka K & Moriyama K (1992). Changes in contractile and non-contractile proteins, intracellular Ca²⁺ and ultrastructures during the development of right ventricular hypertrophy and failure in rats. *Jpn Circ J* **56**, 469-74.

Nogueira-Ferreira R, Moreira-Gon D, SilvaAna F, Duarte JA, Leite-Moreira A, Ferreira R, Henriques-Coelho T (2016). Exercise preconditioning prevents MCT-induced right ventricle remodeling through the regulation of TNF superfamily cytokines, *Intern J Cardiol* 203: 858–866.

Norton GR, Woodiwiss AJ, Gaasch WH, Mela T, Chung ES, Aurigemma GP (2002). Heart failure in pressure overload hypertrophy. The relative roles of ventricular remodeling and myocardial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 39:664-71.

Nunes RB, Alves JP, Kessler LP & Dal Lago P (2013). Aerobic exercise improves the inflammatory profile correlated with cardiac remodeling and function in chronic heart failure rats. *Clinics* **68**, 876-82.

Okada M, Harada T, Kikuzuki R, Yamawaki H, Hara Y (2009). Effects of Telmisartan on Right Ventricular Remodeling Induced by Monocrotaline in Rats. *J Pharmacol Sci* 111:193-200.

Ota JS, Pereira CAC (1998). Cor pulmonale. *Medicina, Ribeirão Preto* 31:241-246.

Pacagnelli FL, Aguiar AF, Campos DHS, Castan EP, Souza RWAS, Almeida FLA, Carani F, Carvalho RF, Cicogna AC & Dal Pai Silva M (2016 a). Training improves the oxidative phenotype of muscle during the transition from cardiac hypertrophy to heart failure without altering MyoD and myogenin. *Exp Physiol* **101**, 1075–1085.

Pacagnelli FL, Okoshi K, Campos DHS, Souza RWA, Padovani CR, Carvalho RF, Aguiar AF, Dal Pai M & Cicogna AC (2014). Physical training attenuates cardiac remodeling in rats with supra-aortic stenosis. *Exp Clin Cardiol* **20**, 3889–3905.

Pacagnelli FL, Sabela AK, Okoshi K, Mariano TB, Campos DHS, Carvalho R, Cicogna AC & Vanderlei LC (2016 b). Preventive physical training exerts a cardioprotective effect in rats treated with monocrotaline. *Int j Exp Pathol* **97**, 238-247.

Qi Y, Zhu Q, Zhang K, Thomas C, Wu Y, Kumar R, Baker KM, Xu Z, Chen S & Guo S (2015). Activation of Foxo1 by Insulin Resistance Promotes Cardiac Dysfunction and β -Myosin Heavy Chain Gene Expression. *Circ Heart Fail* **8**, 198-208.

Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC & Angelis K (2007). Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc diabetol* **13**, 1-7.

Shoulders MD & Raines RT (2009). Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* **78**, 929-958.

Soci UP, Fernandes T & Hashimoto NY (2011). MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. *Physiol Genomics* **43**, 665-73.

Souza-rabbo MP, Silva LFF, Auzani JAS, Picoral M, Khaper N & Belló-klein A (2008). Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *Clinand Experim Pharmacol Physiol* **35**, 944-948.

Souza RWA, Fernandez GJ, Cunha JPQ, Piedade WP, Soares LC, Souza PAT, Campos DHS, Okoshi K, Cicogna AC, Dal-Pai-Silva M & Carvalho RF (2015). Regulation of cardiac microRNAs induced by aerobic exercise training during heart failure. *Am J Physiol Heart CircPhysiol* **309**, 1629-1641.

Souza RWA, Piedade WP, Soares LC, Souza PA, Aguiar AF, Vechetti-Junior IJ, Campos DH, Fernandes AA, Okoshi K, Carvalho RF, Cicogna AC & Dal-Pai-Silva M (2014). Aerobic exercise training prevents heart failure-induced skeletal muscle atrophy by anti-catabolic, but not anabolic actions. *PLoS One* **9**, 1-15.

Svedah K & Macintosh BR (2003). Anaerobic threshold: the concept and methods of measurement. *Canad J Appl Physiol* **28**, 299-323.

Swynghedauw B (1999). Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling. *Physiol Rev* **79**, 215-62.

Vescovo G, Serafini F, DallaLibera L, Leprotti C, Facchin L, Tenderini P & Ambrosio B (1998). Skeletal muscle myosin heavy chain in heart failure: correlation between magnitude of isozyme shift, exercise capacity, and gas exchange measurements. *Am Heart J* **135**, 130-137.

Vescovo G, Jones SM, Harding SE & Poole-wilson PA (1989). Isoproterenol sensitivity of isolated cardiac myocytes from rats with monocrotaline-induced right-sided hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **21**, 1047-61.

Wang JH, Su F, Wang S, Lu XC, Zhang SH, Chen D, Chen NN & Zhong JQ (2014). CXCR6 deficiency attenuates pressure overload-induced monocytes migration and cardiac fibrosis through downregulating TNF- α -dependent MMP9 pathway. *Int J Clin Exp Pathol* **7**, 6514-23.

Xu X & Wan W (2008). Effects of exercise training on cardiac function and myocardial remodeling in post myocardial infarction rats. *J Mol Cell Cardiol* **44**, 114-22.

Yang F; Li P; Li H; Shi Q; Li S & Zhao L (2015). microRNA-29b Mediates the Antifibrotic Effect of Tanshinone IIA in Postinfarct Cardiac Remodeling. *J Cardiovasc Pharmacol* **65**, 456-64.

Yang J, Mou Y, Wu T, Yr Y, Jiang J, Zhao C, Zhu H, Du C, Zhou L & Hu S (2013). Cardiac-specific overexpression of farnesyl pyrophosphate synthase induces cardiac hypertrophy and dysfunction in mice. *Cardiovasc Res* **97**, 490-499.

Zornoff LAM, Paiva SAR, Duarte DR & Spadaro J (2009). Remodelação Ventricular Pós-Infarto do Miocárdio: Conceitos e Implicações Clínicas. *Arq Bras Cardiol* **92**, 157-164.

Zornoff LAM, Matsubara BB, Matsubara LS & Minicucci MF (2006). Cigarette smoke exposure intensifies ventricular remodeling process following myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol* **86**, 276–282.

Zile MR, Baicu CF, Ikonomidis J, Stroud RE, Nietert PJ, Bradshaw AD, Slater R, Palmer BM, Buren PV, Meyer M, Redfield M, Bull D, Granzier H, & LeWinter MM (2015). Myocardial Stiffness in Patients with Heart Failure and a Preserved Ejection Fraction: Contributions of Collagen and Titin. *Circulation* **131**, 1247-1259.

CONFLITO DE INTERESSES

Nenhum potencial conflito de interesses

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Concepção ou desenho do trabalho: TB Mariano, FL Pacagnelli, AKDA Sabela, DHS Campos, AC Cicogna, K Okoshi, AC Oliveira.

Aquisição, análise ou interpretação de dados para o trabalho: TB Mariano, FL Pacagnelli, AKDA Sabela, LAJ Junior, K Okoshi.

Elaboração do trabalho ou sua revisão crítica por conteúdo intelectual importante: TB Mariano, FL Pacagnelli, AKDA Sabela, DHS Campos, AC Cicogna, YP Motta, RF Carvalho.

FINANCIAMENTO

Os autores agradecem à agência financeira CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) a concessão da bolsa PROSUP (Programa de Pós-Graduação de Apoio aos Institutos de Educação Privada).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Departamento de Clínica Médica da UNESP, Botucatu, SP por realizar o ecocardiograma, a expressão gênica e a análise das lâminas.

ANEXO 1

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO NA
REVISTA EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY



[Manuscript Home](#) [Registration and system navigation](#) [Information for Authors](#) [Journal Policies](#) [Peer review process and guidelines](#) [Tips](#) [Contact Us](#) [Logout](#)

Your manuscript has been successfully submitted. Your manuscript tracking number is: EP-RP-2017-086318

Thank you for submitting your manuscript.

You can log in and check the status of your manuscript at any time under Author Tasks.

[Return Home](#)

[Go to Manuscript](#)

ANEXO 2

APROVAÇÃO ÉTICA

06/02/2017	Certificado	
UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO		
PPG – Programa de Pesquisa de Pós-Graduação PROBIC – Programa de Bolsas de Iniciação Científica		
<h3>Parecer Final</h3>		
<p>Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "ANÁLISE DO COLÁGENO CARDÍACO EM RATOS COM HIPERTENSÃO PULMONAR SUBMETIDOS A TREINAMENTO FÍSICO PREVENTIVO", cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) sob o número nº 2483 e tendo como participante(s) FRANCIS LOPES PACAGNELLI (responsável), INES CRISTINA GIOMETTI (discente), WILSON ROMERO NAKAGAKI (discente), ARIANE CAROLINE VELASCO (discente), GUILHERME AUGUSTO ESTEVAM (discente), THAÍAN BRUNO MARIANO (discente), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ACESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.</p>		
Presidente Prudente, 2 de Junho de 2015.		
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <hr style="width: 100%;"/> <small>Prof. Dr. Ines Cristina Giometti Coordenadora Científica da CCPq</small> </div> <div style="text-align: center;">  <hr style="width: 100%;"/> <small>Prof. Ms. Adriana Paloni de Brito Coordenadora da CEUA - UNOESTE</small> </div> </div>		
<small> Valido este documento em www.unoeste.br/legis informando o código de segurança 60404c09f1463f6e79ac76074d76c http://www.unoeste.br/SQP/portal/cadastros/ver_psp/?t=0c424ec589514835ba070ac70074c76c </small>		
1/1		

06/02/2017

Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PROBIC - Programa de Bolsas de Iniciação Científica**Parecer Final**

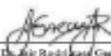
Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO PREVENTIVO NA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA AVALIADO PELAS MIOSINAS CARDÍACAS EM RATOS MODELO DE COR PULMONALE", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 2484 e tendo como participante(s) FRANCIS LOPES PACAGNELLI (responsável), INES CRISTINA GIOMETTI (discente), WILSON ROMERO NAKAGAKI (discente), CAIQUE AGUIAR DOS SANTOS (discente), KECIA CHAYANE SANTOS DA SILVA (discente), LETICIA ESTEVAM ENGEL (discente), RAQUEL BEATRIZ DE SOUZA PEREIRA (discente), THAOGAN BRUNO MARIANO (discente), ANTÔNIO CARLOS CICOGNA (externo), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ACESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE do Presidente Prudente/SP.

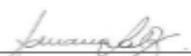
Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 08/04/2015.

Vigência do projeto: 08/2015 a 08/2018.

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
WISTAR	0	0			NÃO HÁ NECESSIDADE

Presidente Prudente, 5 de Maio de 2016.


 Prof. Dr. José Roberto Garcia Jr.
 Coordenador Científico de CEUA


 Prof. Ms. Adriana Falci de Brito
 Coordenadora da CEUA - UNOESTE

Validar este documento em www.unoeste.br/leg informando o código de segurança: ecd258b0e36c7712ab9c0213a18a32

<http://www.unoeste.br/SQP/verificacao/ver.asp?n=bcd258b0e36c7712ab9c0213a18a32>

1/1