

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

EFEITO DE DIFERENTES INTENSIDADES DE EXERCÍCIO FÍSICO
AERÓBICO SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES NA
HIPERTENSÃO PULMONAR

Ricardo Meirelles Borba

Porto Alegre

2015

EFEITO DE DIFERENTES INTENSIDADES DE EXERCÍCIO FÍSICO
AERÓBICO SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES NA
HIPERTENSÃO PULMONAR

RICARDO MEIRELLES BORBA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós
Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, como requisito parcial
para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Katya Vianna Rigatto

Porto Alegre

2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Dra. Katya Vianna Rigatto, pela oportunidade que me deu de crescer, pela orientação e pela incondicional contribuição científica e intelectual, sem a qual, não seria possível a concretização desse estudo.

À todos os integrantes do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFCSPA, em especial à Ana Paula, Fernanda, Ana Amélia, Gabriela, Taís e Walter, que transformaram o ambiente científico em um local muito mais alegre.

À Dra. Adriane Belló Klein e ao Dr. Alex Sander da Rosa Araújo por terem, prontamente, aberto as portas do seu laboratório quando eu os procurei, à todos os integrantes do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFRGS, em especial aos colegas que me auxiliaram diretamente Jéssica, Rafael Fernandes e Alexandre.

À minha Família, por me aconselhar e apoiar em todas as decisões que eu tomei e ser a minha fonte de amor, respeito e honestidade desde sempre.

Aos meus amigos, responsáveis pelos momentos de descontração em meio às perturbações inevitáveis.

À Bruna, minha amada namorada, que me acompanhou e me apoiou, pacientemente, nessa árdua caminhada, sempre com um sorriso no rosto.

À todos que me ajudaram de alguma forma.

Por fim, agradeço do fundo do meu coração e dedico todo meu respeito aos Ratos que foram submetidos ao estudo.

Obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
ABREVIATURAS.....	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Sistema Cardiorrespiratório.....	13
1.2 Hipertensão Pulmonar.....	13
1.3 Sistema Nervoso Autônomo e Sistema Renina Angiotensina.....	15
1.4 Exercício Físico.....	18
2. HIPÓTESES.....	20
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivos gerais.....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1 Local de execução.....	21
4.2 Animais e cálculo da amostra.....	21
4.3 Grupos experimentais.....	21
4.4 Programa de treinamento.....	22
4.5 Teste de esforço máximo.....	22
4.6 Análises Morfométricas.....	23
4.7 Análises Hemodinâmicas.....	23
4.8 Análise do Controle Autonômico.....	23
4.9 Análise do SRA por Western Blot.....	24
4.10 Análise estatística.....	24
5. RESULTADOS.....	26
5.1 Parâmetros Morfométricos e Hemodinâmicos.....	26
5.2 Controle autonômico.....	27
5.3 Expressão proteica.....	32
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÃO.....	43
8. REFERÊNCIAS.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros morfométricos.....	26
Tabela 2: Hemodinâmica do VD.....	26
Tabela 3: Hemodinâmica sistêmica.....	27
Tabela 4: Teste de esforço máximo.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Análise espectral.....	29
Figura 2: Variabilidade da Frequência Cardíaca.....	30
Figura 3: Balanço Simpatovagal.....	31
Figura 4: Expressão proteica de ECA no VD.....	33
Figura 5: Expressão proteica de ECA2 no VD.....	34
Figura 6: Expressão proteica de AT1R no VD.....	35
Figura 7: Expressão proteica de AT2R no VD.....	36
Figura 8: Expressão proteica de Mas no VD.....	37

ABREVIATURAS

O₂: Oxigênio

CO₂: Dióxido de Carbono

VD: Ventrículo Direito

HP: Hipertensão Pulmonar

SNA: Sistema Nervoso Autônomo

VFC: Variabilidade da Frequência Cardíaca

SRA: Sistema Renina Angiotensina

ECA: Enzima Conversora de Angiotensina

Ang II: Angiotensina II

ECA2: Enzima Conversora de Angiotensina 2

Ang-(1-7): Angiotensina-(1-7)

AT1R: Receptor de Angiotensina II do Tipo 1

AT2R: Receptor de Angiotensina II do Tipo 2

Mas: Receptor de Angiotensina-(1-7)

MCT: Monocrotalina

HP-MCT: Hipertensão Pulmonar Induzida por Monocrotalina

CO: Grupo Controle

MCT-S: Grupo Monocrotalina Sedentário

MCT-B: Grupo Monocrotalina Treinamento Intensidade Baixa

MCT-M: Grupo Monocrotalina Treinamento Intensidade Moderada

PA: Pressão Arterial Sistêmica

FC: Frequência cardíaca

PSVD: Pressão Sistólica do Ventrículo Direito

PDFVD: Pressão Diastólica Final do Ventrículo Direito

FFT: Transformada Rápida de Fourier

HF: Componente de Alta Frequência

LF: Componente de Baixa Frequência

HFa: Alta Frequência Absoluto

LFa: Baixa Frequência Absoluto

HFnu: Alta Frequência Normalizado

LFnu: Baixa Frequência Normalizado

VAR RR: Variabilidade dos Pontos RR

RESUMO

Introdução: A hipertensão pulmonar (HP) se caracteriza pela presença de pressão média na artéria pulmonar maior ou igual a 25 mmHg em repouso e aumento progressivo da resistência vascular pulmonar, levando a hipertrofia patológica do ventrículo direito (VD), seguida de falência do ventrículo e morte súbita. Evidências mostram que na HP há uma disfunção no sistema nervoso autônomo (SNA), apresentando redução da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), com aumento da modulação simpática e redução da modulação vagal. Além disso, há um desequilíbrio do sistema renina angiotensina (SRA), com aumento do eixo que causa vasoconstrição, inflamação, proliferação e fibrose, composto pela enzima conversora de angiotensina, angiotensina II e receptor AT1 e redução do eixo que causa vasodilatação e efeitos anti-inflamatórios, anti-proliferativos e anti-fibróticos [ECA2-Ang-(1-7)-Mas]. Está bem claro na literatura que o exercício físico pode modular as respostas hemodinâmicas, porém, não se sabe qual a intensidade de exercício físico aeróbico que promove melhor benefício sobre a modulação dos SNA e SRA, bem como o impacto sobre a hipertrofia do VD na HP. **Hipóteses:** O exercício físico aeróbico reduz a hiperatividade simpática e aumenta a modulação vagal no coração de ratos com HP e, no SRA, melhora a participação dos componentes do eixo vasodilatador em relação aos componentes do eixo vasoconstritor. **Objetivos:** Avaliar o efeito de duas intensidades de exercício físico aeróbico sobre o SNA e o SRA no coração de ratos com HP. **Materiais e métodos:** HP foi induzida em ratos Wistar machos através de uma dose única de 50mg/kg monocrotalina (MCT). Grupos: Controle (CO), MCT-sedentário (MCT-S), MCT-treinamento intensidade baixa (MCT-B), MCT-treinamento intensidade moderada (MCT-M), o qual 40% e 60% da velocidade máxima obtida no teste de esforço foi utilizada nos grupos MCT-B e MCT-M, respectivamente. Os exercitados realizaram um protocolo de treinamento aeróbico em esteira por 3 semanas (5x/semana/50min). Para analisar a participação do SNA foram aferidas a VFC, através da variabilidade dos pontos RR (VAR RR), e pela análise espectral, as bandas de baixa (LF) e alta frequência (HF) que representam a atividade simpática e parassimpática, respectivamente e absoluta (a) e normalizada (nu), que indica a proporcionalidade simpática e parassimpática. Para a análise do SRA

investigamos a expressão proteica pela técnica de Western Blot de homogeneizado de VD. Os dados foram comparados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). **Resultados e discussão:** O Peso do VD e a pressão sistólica no VD (PSVD) foram significativamente maiores no MCT-S quando comparados aos demais ($P < 0,05$). A VAR RR dos grupos treinados apresentaram valores estatisticamente ($P < 0,05$) maiores que os grupos que não praticaram atividade física (MCT-M e MCT-B vs MCT-S, MCT-B vs CO). No valor de LFa, assim como no valor de LFnu o grupo MCT-S foi significativamente ($P < 0,05$) maior que os demais. Já os valores de HFa foram significativamente ($P < 0,05$) menores no grupo sedentário do que no MCT-B. Nos grupos que praticaram exercício o HFa foi significativamente ($P < 0,05$) maior do que no CO. Porém, o HFnu foi estatisticamente ($P < 0,05$) menor no grupo MCT-S em relação à todos os outros grupos. O balanço simpátovagal (LF/HF), embora não tenha sido estatisticamente diferente entre os outros grupos, foi maior no grupo MCT-S. Já na análise pelo Western Blot, houve redução significativa ($P < 0,05$) da expressão de ECA nos grupos que praticaram exercício físico. Houve aumento significativo ($P < 0,05$) da expressão de ECA2 do grupo MCT-M em relação à todos os outros; e aumento significativo ($P < 0,05$) em todos os grupos quando comparados ao CO. Quanto à expressão do receptor AT1, AT2 e Mas não houve diferença significativa entre os grupos. **Conclusão:** em conjunto, nossos resultados demonstraram que o exercício físico aeróbico, principalmente o de baixa intensidade, pode melhorar parâmetros como VFC, modulação parassimpática para o coração, equilíbrio entre as enzimas ECA e ECA2 do SRA. Além disso, o exercício promoveu atenuação da hipertrofia do VD e da PSVD. Em conjunto esses resultados contribuem para a redução do risco para evento cardiovascular nesses animais.

ABSTRACT

Introduction: Pulmonary hypertension (PH) is characterized by medium pressure in the pulmonary artery higher or equal to 25 mmHg at rest and progressive increase in pulmonary vascular resistance, leading to pathological hypertrophy of the right ventricle (RV), followed by ventricular failure and sudden death. Evidence shows that there is a dysfunction in PH in the autonomic nervous system (ANS), with reduced heart rate variability (HRV), with increased sympathetic modulation and reduced vagal modulation. Furthermore, there is an imbalance of the renin angiotensin system (RAS), an increase of the shaft that causes vasoconstriction, inflammation, proliferation and fibrosis, comprising the angiotensin converting enzyme, and angiotensin II AT1 receptor and reduce the shaft which causes vasodilation and anti effects inflammatory, anti-proliferative and anti-fibrotic [ACE2-Ang-(1-7)-Mas]. It is clear in the literature that physical exercise can modulate the hemodynamic responses, however, it is unclear what the aerobic exercise intensity that promotes best benefit on the modulation of SNA and SRA as well as the impact on RV hypertrophy in PH . **Hypothesis:** The aerobic exercise, especially the low-intensity, reduce sympathetic hyperactivity and increase vagal modulation in rat heart with PH and in RAS improves the participation of components of the vasodilator axis with respect to the components of the vasoconstrictor axis. **Aims:** To evaluate the effect of two aerobic exercise intensities on the ANS and the RAS in the heart of rats with PH. **Methods:** HP was induced in male Wistar rats with a single dose of 50 mg / kg monocrotaline (MCT). Groups: control (CO), MCT-sedentary (MCT-S), MCT-low intensity training (MCT-B), MCT-moderate intensity training (MCT-M), which 40% and 60% of the maximum speed obtained in stress test was used in the MCT-B groups and MCT-M, respectively. Exercised performed an aerobic training protocol on a treadmill for 3 weeks (5x / week / 50min). To analyze the participation of the ANS were measured HRV through the variability of RR points (VAR RR), and the spectral analysis, the low bands (LF) and high frequency (HF) representing the sympathetic and parasympathetic activity, respectively and absolute (a) and normalized (nu), which indicates the sympathetic and parasympathetic proportionality For the analysis of RAS investigate protein expression by Western blot technique by homogenized RV. Data were compared by two-way ANOVA followed by Tukey test (P <0.05). **Results and discussion:**

The RV weight and RV systolic pressure (RVSP) were significantly higher in MCT-S compared to the others ($P < 0.05$). The VAR RR in the trained groups showed statistically values ($P < 0.05$) higher than those groups that did not practice physical activity (MCT-M and MCT-B vs MCT-S, MCT-B vs CO). The value of LFa as well as the LFnu MCT-S group was significantly ($P < 0.05$) higher than the other. The HFa values were significantly ($P < 0.05$) lower in the sedentary group than in the MCT-B. In the groups that they practiced physical exercise HFa was significantly ($P < 0.05$) higher than in CO. But the HFnu was statistically ($P < 0.05$) lower in the MCT-S group compared to all other groups. The sympathovagal balance (LF / HF), although it was not statistically different from the other groups, was higher in the MCT-S group. In the analysis by Western Blot, there was a significant reduction ($P < 0.05$) ACE expression in groups who practiced exercise. A significant increase ($P < 0.05$) of ACE2 expression of MCT-M group compared to all others; and significant increase ($P < 0.05$) in all groups compared to CO. As for the expression of AT1 receptor, AT2 and Mas there was no significant difference between groups. **Conclusion:** together, our results have shown that aerobic exercise, mainly of low intensity, can improve parameters such as HRV, parasympathetic modulation to the heart, balance between the enzyme ACE and ACE2 of RAS. In addition, the exercise promoted attenuation of RV hypertrophy and RVSP. Together, these results contribute to reducing the risk for cardiovascular events in these animals.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Cardiorrespiratório

O sistema cardiovascular transporta e distribui substâncias essenciais, assim como remove subprodutos metabólicos. O sistema que realiza essas tarefas é composto pelo coração e os vasos sanguíneos. O coração é, em verdade, dividido em duas bombas: uma que propõe sangue para os pulmões para troca de oxigênio (O₂) por dióxido de carbono (CO₂) e outra que propõe o sangue para os demais tecidos do corpo. O sangue entra no ventrículo direito (VD) através do átrio direito e é bombeado para o sistema arterial pulmonar com pressão média muito mais baixa do que a encontrada nas artérias sistêmicas. Em seguida passa pelos capilares pulmonares eliminando o CO₂ e absorvendo o O₂ e volta pelas veias pulmonares para o átrio esquerdo antes de chegar no ventrículo esquerdo, sendo bombeado para a periferia, fechando o ciclo⁽¹⁾.

Normalmente, a resistência vascular pulmonar é de 10% do valor total da resistência vascular sistêmica. A baixa pressão, em relação à sistêmica, explica o porquê do VD apresentar paredes mais finas que o ventrículo esquerdo⁽¹⁾. Quando a resistência vascular do pulmão aumenta, pode resultar na hipertensão pulmonar (HP)⁽²⁾ aumentando o trabalho produzido pelo VD, necessário para manter o suprimento sanguíneo, podendo causar hipertrofia e possível insuficiência do lado direito do coração.

1.2 Hipertensão Pulmonar

A HP é o nome da doença que acomete o leito vascular pulmonar que resulta em pressão pulmonar aumentada de forma sustentada⁽³⁾. Se caracteriza pela presença de pressão média na artéria pulmonar maior ou igual a 25 mmHg em repouso⁽⁴⁾.

Nos estágios iniciais da doença, o indivíduo apresenta pressão arterial pulmonar elevada mas com débito cardíaco relativamente normal. Ao longo do tempo, o volume sistólico reduz-se progressivamente enquanto a pressão arterial pulmonar aumenta^(5, 6). A pressão atrial direita e a pressão ventricular diastólica final aumentam devido a severa elevação na resistência vascular pulmonar. Inicialmente o paciente, praticamente, não apresenta sintomas e a sensação de dispneia pode aparecer apenas na prática de exercícios físicos.

A patogênese da doença está relacionada com disfunção endotelial, remodelamento vascular, desequilíbrio nos mecanismos vasoconstritor e vasodilatador⁽⁷⁾, assim como distúrbios no sistema nervoso simpático e parassimpático, que estão relacionados com as anormalidades hemodinâmicas⁽⁸⁾. É caracterizada pelo aumento progressivo da resistência vascular pulmonar, levando a hipertrofia patológica do ventrículo direito (VD), comumente seguida de falência do ventrículo e morte súbita^(4, 9). Há uma prevalência maior em mulheres do que em homens⁽³⁾. Pode ocorrer como um fenômeno isolado, chamada de hipertensão pulmonar primária, ou associado a várias alterações cardiopulmonares, tais como: doença pulmonar obstrutiva crônica, fibrose pulmonar idiopática, entre outras⁽⁴⁾. O seu diagnóstico geralmente ocorre na fase avançada da doença^(10, 11) com sintomas como a intolerância ao exercício, dispneia e a fadiga decorrentes do baixo débito cardíaco, que tem caráter progressivo levando à ineficiência na oferta de oxigênio aos tecidos. Em conjunto, esses achados levam o paciente a limitar as suas atividades diárias com conseqüente redução da qualidade de vida⁽¹²⁾. A sobrevida média desses pacientes é de 2 a 3 anos a partir do momento do diagnóstico^(13, 14).

À medida que o débito cardíaco diminui, a hipóxia e a dispneia aumentam tornando a fadiga mais aparente e os eventos de síncope mais recorrentes. Pode acontecer também, congestão venosa com manifestações de edema⁽³⁾. Uma vez que a insuficiência ventricular direita se manifesta, a sobrevida acima de dois anos se torna muito difícil^(14, 15). Com a progressão da insuficiência do VD, a dispneia, a fadiga e o edema se agravam e a insuficiência ventricular esquerda pode ocorrer em decorrência da disfunção ventricular direita. Pacientes com HP normalmente morrem devido à insuficiência ventricular direita ou têm morte súbita^(3, 16, 17).

1.3 Sistema Nervoso Autônomo e Sistema Renina Angiotensina

O sistema nervoso autônomo (SNA) controla a maior parte das funções viscerais do corpo e é dividido em sistema nervoso simpático e parassimpático⁽¹⁸⁾. A frequência cardíaca (FC) responde dinamicamente às alterações homeostáticas mediadas pelos componentes simpático e parassimpático, sincronizando a pressão arterial sistêmica (PA) e a FC momento

a momento⁽¹⁹⁾. Alterações da FC fornecem um indicador sensível e antecipado de saúde, pois expressam de forma quantitativa o resultado das ações desses componentes e determinam a variabilidade da frequência cardíaca (VFC). Uma baixa VFC é frequentemente um indicador de adaptação insuficiente do SNA⁽¹⁹⁾. Quanto menor a VFC, maiores são os riscos para doenças cardiovasculares e ocorrência de eventos que podem culminar com a morte^(20, 21). Recentes evidências mostram que a HP também apresenta redução da VFC, com aumento da modulação simpática e redução da modulação vagal^{(22), (23), (24)}.

Considerando a importância da interação entre a PA e a FC e o estudo das alterações entre esses dois parâmetros, destacamos a análise da VFC, no domínio do tempo, que leva em consideração os intervalos de tempo entre sucessivos ciclos cardíacos normais (intervalo RR) de um registro eletrocardiográfico. Outra medida notável de análise do SNA é a análise no domínio da frequência, que descreve as oscilações periódicas da frequência cardíaca decompostas em diferentes frequências e amplitudes e provém informações sobre a intensidade relativa do ritmo sinusal no coração^{(19), (25)}.

Nesse contexto, e na tentativa de encontrar um tratamento não medicamentoso que possa contribuir com as estratégias atuais de tratamento de HP e para melhorar a qualidade de vida desses pacientes, estudos têm demonstrado que o treinamento aeróbico é eficaz em aumentar a VFC de indivíduos idosos com insuficiência cardíaca⁽²⁶⁾ e em indivíduos que tiveram infarto do miocárdio⁽²⁷⁾. Da mesma forma, Brum et al. (2011) e Pagani et al. (1988) mostraram que o exercício reduziu a hiperatividade simpática e aumentou a atividade vagal^{(28), (29)}, demonstrando que um protocolo de treinamento aeróbico pode ser uma medida extremamente promissora no sentido de reduzir o desequilíbrio entre as atividades simpática e vagal.

No entanto, não está claro na literatura qual o protocolo que efetivamente melhora a sintomatologia e a qualidade de vida desses pacientes com o menor risco possível. Neste sentido, um dos objetivos desse estudo, foi averiguar qual protocolo de exercício físico traz mais benefícios na HP experimental, se o de intensidade baixa ou moderada.

Além disso, tem sido sugerido que a ativação simpática está diretamente associada ao sistema renina angiotensina (SRA). Fortes evidências indicam que a Angiotensina II (Ang II) exerce um efeito simpatoexcitatório central, uma vez

que o bloqueio farmacológico da Ang II, através de inibidores da sua enzima conversora de angiotensina (ECA) e/ou bloqueadores dos receptores AT1 (AT1R), tem efeitos também sobre a modulação simpática^(30, 31), deixando clara a forte associação entre os dois sistemas.

Em 1898, Tigerstedt e Bergman⁽³²⁾ publicaram a descoberta de uma substância sintetizada nos rins, com efeitos pressóricos, que batizaram como “Renina”. Eles já imaginavam que a renina poderia, de alguma forma direta ou indireta, estar associada com a hipertrofia cardíaca encontrada na doença renal e hipertensão. Era o princípio do estudo do complexo SRA. No início dos anos 70, os componentes clássicos do SRA já eram conhecidos e já se sabia que esse sistema tinha um papel fundamental na regulação da pressão arterial e do equilíbrio hídrico.

A renina cliva uma proteína sintetizada no fígado, o angiotensinogênio, para formar Angiotensina-(1-10), conhecida como Angiotensina I. Esta, por sua vez, é quebrada por outra enzima, chamada de ECA e forma Angiotensina-(1-8), a Ang II. A Ang II ao se ligar no seu receptor, o AT1R, causa vasoconstrição, estimula o sistema nervoso central, estimula a liberação de aldosterona, do hormônio antidiurético, promove hipertrofia, proliferação e fibrose. Ang II também pode se ligar num outro receptor, porém com uma afinidade menor, o AT2R, causando efeitos opostos, como vasodilatação, liberação de óxido nítrico, anti-proliferação, anti-hipertrofico, anti-fibrótico, antiarrítmica e antitrombótico. Porém, hoje se sabe que além do “SRA circulante”, há também o “SRA tecidual” na maioria dos tecidos e órgãos estudados fazendo com que o SRA seja não apenas endócrino, como também parácrino.

A atual visão do SRA trouxe à tona novos componentes desse sistema, entre eles a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), que tem como função primordial a conversão de Ang II em Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)]. A Ang-(1-7) se liga ao receptor Mas, primeiramente descrito por Santos (2004)⁽³³⁾, com funções semelhantes aos efeitos da ligação da Ang II ao AT2R⁽³⁴⁾.

Sabe-se que o eixo composto pela ECA, Ang II e o AT1R (ECA-Ang II-AT1R) promove vasoconstrição, proliferação e fibrose, enquanto o eixo formado pela ECA2, Ang-(1-7) e o receptor Mas [ECA2-Ang-(1-7)-Mas] protege os pulmões por induzir intrinsecamente ações protetoras contra regulatórias do eixo ECA-Ang II-AT1R⁽³⁵⁾, tais como: atenuar os efeitos vasoconstritores,

proliferativos, fibróticos e inflamatórios da Ang II⁽³⁶⁾. A ECA2 também está expressa em diversas células pulmonares além do endotélio pulmonar⁽³⁷⁾.

Estudos em humanos e animais de laboratório sugerem que intervenções que diminuem as ações do eixo ECA-Ang II-AT1R ou que ativem o eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas são eficazes na atenuação do remodelamento vascular associado à HP⁽³⁸⁾. De fato, foi demonstrado que o estímulo à ECA2 reduz alguns dos efeitos deletérios em ratos com HP induzida por MCT (HP-MCT). Por outro lado, a superexpressão de ECA2 nesses ratos atenua os aumentos da pressão sistólica no ventrículo direito e aumenta a razão receptor AT2R/AT1R⁽³⁹⁾.

Além disso, a administração de XNT, um ativador da ECA2 endógena, desacelera o remodelamento vascular no desenvolvimento da HP, reduzindo a hipertrofia cardíaca, a fibrose ventricular e intersticial renal⁽⁴⁰⁾, indicando que o aumento na participação do eixo formador de Ang-(1-7) apresenta efeitos benéficos na HP. A Ang-(1-7) promove diminuição da pressão sistólica no VD e da hipertrofia desse ventrículo, redução do engrossamento da parede vascular e da fibrose pulmonar⁽⁴¹⁾. Por outro lado, a administração do antagonista da Ang-(1-7), o A779, é capaz de reduzir esses efeitos benéficos protagonizados na HP, demonstrando a importância da ECA2^(41, 42). Dessa forma, um desequilíbrio entre esses eixos do SRA pode gerar um predomínio de um ou outro eixo, promovendo injúria ou proteção.

Não estão bem estabelecidos na literatura a importância dos dois eixos do SRA na fisiopatologia da HP. Da mesma forma, não está bem descrito ainda o efeito do treinamento aeróbico sobre esses eixos e as suas consequências sobre a hipertrofia cardíaca, o fato do exercício de promover uma hipertrofia benéfica ao coração pode favorecer o bombeamento para uma circulação de pressão mais elevada e ainda induzir a angiogênese que aumenta a distribuição sanguínea para os tecidos.

Além disso, experimentos sugerem que a ligação da Ang-(1-7) com o seu receptor específico, o Mas, está envolvida nos efeitos benéficos do treinamento físico em ratos hipertensos^(33, 43, 44).

Induzida pelo exercício em animais de laboratório, a hipertrofia cardíaca fisiológica está associada com a diminuição da ECA e da Ang II e com o aumento da ECA2 e da Ang-(1-7) no coração, causando uma maior vasodilatação o que melhora o aporte de sangue ao músculo cardíaco⁽⁴⁵⁾.

Por outro lado, os efeitos do treinamento aeróbico contínuo em modelo animal podem induzir dois fenótipos clínicos distintos de HP. O exercício é considerado benéfico quando a HP é estável com preservação da função cardíaca, e prejudicial na HP progressiva⁽⁴⁶⁾. Esses achados indicam que a progressão da doença e a adaptação do VD podem ser importantes determinantes clínicos para se ter, ou não, resposta favorável ao exercício físico na HP. Sendo assim, o estabelecimento de um protocolo de exercício que estimule os efeitos desejáveis e promotores do bem estar pode melhorar a qualidade de vida e a sobrevida dos pacientes com HP.

1.4 Exercício Físico

Sabe-se que o exercício pode modular as respostas hemodinâmicas, melhorar a morfologia dos vasos arteriais e induzir a angiogênese⁽⁴⁷⁾, porém, não se sabe qual o protocolo de exercícios ideal para pacientes com HP. Tradicionalmente pacientes com HP eram advertidos a não praticar exercício físico. Porém, atualmente, os pacientes são encorajados a serem mais ativos e, não só isso, a integrar um programa de treinamento para melhorar a performance funcional^(11, 38). Sendo assim, a prática de exercícios poderia ser indicada mediante uma avaliação criteriosa considerando suas vantagens e desvantagens, tanto em doenças severas como a HP^(48, 49), quanto naquelas doenças nas quais a falência cardíaca esquerda está presente⁽⁵⁰⁾.

O exercício físico melhora a função endotelial e a qualidade de vida dos pacientes^(47, 48). Dessa forma, dependendo do protocolo utilizado, os riscos podem ser minimizados e permitir a sua recomendação mesmo em casos mais graves como aqueles encontrados na HP.

Handoko et al. (2009)⁽⁴⁶⁾, comparando duas doses de MCT em um protocolo de exercício físico em ratos com HP estável e ratos com HP progressiva, observaram que o treinamento foi bem tolerado, promovendo melhora da performance no teste de resistência no grupo estável. No entanto, na HP progressiva o treinamento aumentou a mortalidade e o remodelamento vascular pulmonar. O resultado deste estudo demonstra a importância de se estabelecer um protocolo de exercícios que seja mais seguro e que permita um equilíbrio entre as vantagens e as desvantagens da prática de exercício físico em pacientes com HP.

Não sabemos qual a intensidade de exercício aeróbico que promove melhor benefício sobre a modulação dos SNA e SRA, e quais as consequências sobre a hipertrofia cardíaca. No entanto, dados preliminares do nosso laboratório ainda não publicados indicam que o exercício físico de intensidade baixa reverte a hipertrofia cardíaca direita e reestabelece a pressão sistólica do ventrículo direito, além de melhorar parâmetros respiratórios de ratos com HP-MCT.

O tratamento para esta doença permanece elusivo, então, o desenvolvimento de tratamentos alternativos não farmacológicos é de suma importância e representa um grande desafio. O exercício físico é de fácil implementação e pode representar uma alternativa para o tratamento. Estudos demonstram que o exercício associado à medicação apresenta efeitos terapêuticos melhores do que o uso da medicação isoladamente. Este fato fica claramente demonstrado no estudo de Grünig et al (2011) que observaram, em pacientes que realizaram treinamento físico associado ao tratamento medicamentoso, uma taxa de sobrevida de 100% no primeiro ano e de 95% no segundo ano. Já com uso isolado da medicação, a taxa de sobrevida foi de apenas 93% e 83,1% no primeiro e segundo ano, respectivamente⁽⁵¹⁾. Esses resultados deixam claro o impacto do exercício na sobrevida dos pacientes com HP. Já foi demonstrado que mesmo em doenças severas como a HP^(48, 49), e naquelas com falência cardíaca esquerda⁽⁵⁰⁾, o exercício físico melhora a função endotelial e a qualidade de vida dos pacientes. Porém, não se sabe ainda qual o protocolo que, se adotado, garantiria segurança e eficácia ao mesmo tempo no tratamento. Então qual seria a intensidade ideal do exercício realizado por pacientes com HP?

Dessa forma, considerando que o prognóstico dos pacientes com HP está relacionado à modulação do SNA^(8, 52) e à atividade do SRA^(7, 53-55) e que o prejuízo nesses sistemas leva a uma redução da VFC^(56, 57) e do eixo vasodilatador (ECA2-Ang-(1-7)-Mas) do SRA, a melhoria no balanço simpátovagal e entre os eixos do SRA assume um papel importante na sobrevida desses pacientes.

Acreditamos que a prática de exercício físico supervisionado, com um protocolo que apresente o mínimo de riscos e o máximo de benefícios pode representar uma alternativa para melhora da qualidade de vida e taxa de sobrevida dos pacientes com HP. Acreditando nessas premissas, avaliamos o

efeito de duas intensidades de treinamento aeróbico sobre a modulação autonômica e o SRA para o coração, com o intuito de verificar se o exercício aeróbico aumenta a VFC e a atividade dos componentes protetores do SRA na HP.

2. HIPÓTESES

- O exercício físico aeróbico reduz a hiperatividade simpática e aumenta a modulação vagal do coração de ratos com HP-MCT;

- O exercício físico aeróbico promove predomínio do eixo vasodilatador [ECA2-Ang-(1-7)-Mas] em relação aos componentes do eixo vasoconstritor (ECA-Ang II-AT1R);

- Os efeitos benéficos do exercício físico são mais visíveis na baixa intensidade.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar o efeito de duas intensidades de exercício físico aeróbico sobre o SNA e o SRA em ratos com HP-MCT.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar no o coração a/o:

- Participação dos eixos vasodilatador e vasoconstritor do SRA;
- Participação do sistema nervoso simpático e parassimpático;
- Peso e Pressão do VD;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local de execução

Estudo experimental realizado na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso dos Animais em 28 de maio de 2013, parecer 115/13.

4.2 Animais e cálculo da amostra

O tamanho da amostra foi calculado a priori, utilizando o programa SigmaPlo 11.0, para um erro alfa $\leq 0,05$ e um poder estatístico de 80% ($\beta=0,20$), baseado no parâmetro PSVD de Rigatto et al (2013)⁽²²⁾, que utilizaram a mesma dose de monocrotalina (MCT) para induzir HP nos ratos.

Foram utilizados 24 ratos Wistar machos com cinco semanas de vida provenientes do biotério da UFCSPA e mantidos dois animais por caixa. Ração e água foram fornecidos ad libitum, a temperatura ambiente foi de 22 a 24°C, com ciclo claro-escuro de 12 horas (07:00-19:00, período claro). Todos os procedimentos experimentais adotados para os animais obedeceram às normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde⁽⁵⁸⁾.

4.3 Indução da HP

Para indução da HP foi utilizada dose única de MCT por via subcutânea (50 mg/kg - Sigma). A MCT é um alcaloide, extraído da semente da planta *Crotalaria* sp. Uma única dose de MCT causa HP em até 3 semanas e leva à mortalidade na maioria dos ratos entre 6 e 8 semanas. A MCT induz dano endotelial, edema, remodelamento pulmonar, apoptose de células endoteliais, geração de espécies reativas de oxigênio e hipertrofia do ventrículo direito, através de mecanismo pouco conhecido. Os resultados apresentados por animais tratados com esta substância mimetizam várias alterações fisiopatológicas apresentadas por humanos portadores de HP primária⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾.

4.3 Grupos experimentais

Os ratos foram divididos em quatro grupos: Grupo Controle (CO); Grupo MTC sedentário (MCT-S); Grupo MTC Treinamento Intensidade Baixa (MCT-B); Grupo MTC Treinamento Intensidade Moderada (MCT-M).

4.4 Programa de treinamento

Inicialmente, os animais passaram por um período de uma semana de adaptação em esteira rolante adaptada para ratos (AVS®). A adaptação consistiu na colocação dos animais na esteira desligada por 10 minutos, seguido por uma caminhada de 5 m/min por 5 minutos. Ao final dessa semana, os ratos foram randomicamente alocados em algum dos quatro grupos para, então, ser realizado o teste de esforço máximo. De acordo com o resultado deste teste foi determinada a intensidade do treinamento físico⁽⁶²⁾. Terminada essa etapa, os animais foram submetidos à injeção subcutânea de MCT nos grupos tratados e solução salina, no grupo CO.

Nas três semanas seguintes os grupos submetidos ao treinamento físico aeróbico realizaram sessões de corrida em esteira, sem inclinação, cinco vezes na semana com duração de sessenta minutos, sendo que eram 5 minutos de aquecimento, 50 minutos de caminhada na intensidade determinada e 5 minutos de desaquecimento. O grupo intensidade moderada (MCT-M) correu em uma velocidade correspondente a 60% da velocidade máxima encontrada no teste de esforço máximo, considerada intensidade moderada de acordo com Handoko et al⁽⁴⁶⁾. O grupo intensidade baixa (MCT-B) caminhou numa intensidade correspondente a 40% da velocidade máxima. Os grupos monocrotalina sedentário (MCT-S) e CO foram colocados próximos à esteira durante todo o período de treinamento.

Vinte e quatro horas após a última sessão de treinamento, os animais realizam novamente o teste de esforço para verificar a aptidão física ao final do treinamento.

4.5 Teste de esforço máximo

O teste de esforço máximo foi realizado com todos os ratos em uma esteira ergométrica com estimulação elétrica (AVS®). A esteira iniciou à 5 m/min, com incremento de velocidade correspondente a 5 m/min a cada 3 minutos. O ângulo de inclinação utilizado era igual à zero e permanecia assim até o final do protocolo. A exaustão do animal determinava o final do teste e para definir isso, o animal precisava se opor à corrida, mantendo-se por mais de 15 segundos em cima do estímulo elétrico (2 mV).

4.6 Análises Morfométricas

Após os registros hemodinâmicos, ainda anestesiados, os animais foram mortos por decapitação. Os corações foram retirados, pesados inteiros para então separar os ventrículos direito e esquerdo para nova pesagem.

4.7 Análises Hemodinâmicas

Um dia após realizarem o último teste de esforço máximo os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura de cetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) para realização dos registros hemodinâmicos.

Os animais foram cateterizados conforme procedimento cirúrgico descrito por Waynforth e Flecknell (1992)⁽⁶³⁾. As cânulas foram inseridas na artéria carótida para medir a pressão arterial sistêmica (PA); e no ventrículo direito (VD), através da veia jugular, para registro de pressão ventricular direita. A pressão sistólica do ventrículo direito e a pressão diastólica final do ventrículo direito (PSVD e PDFVD, respectivamente), e a pressão arterial sistólica e diastólica foram monitoradas através de um transdutor de pressão (modelo 041-500503A – CDX III Transducer With Male/Male Linden Fittings®, Argon, Athens, TX, EUA), calibrado e conectado a um amplificador de sinais (General Purpose, Stemtech®, Wood Dale, IL, USA) e então transformados para o software (CODAS – Data Acquisition System®, PC) com frequência de amostragem de 2000 Hz, expressos em mmHg.

4.8 Análise do Controle Autonômico

A partir dos registros hemodinâmicos arteriais, foi realizada a avaliação do controle autonômico nesse modelo experimental através da análise espectral pelo método da Transformada Rápida de Fourier (FFT). A análise do controle autonômico foi dividida em duas. Uma foi realizada no domínio da frequência, sendo o componente de alta frequência (HF), um indicador da atuação do nervo vago sobre o coração. Por outro lado, o componente de baixa frequência (LF) é decorrente da ação conjunta dos componentes vagal e simpático sobre o coração, com predominância do sistema nervoso simpático. Esses componentes podem ser expressos em valores absolutos (LFa e HFa) e percentuais, ou normalizados (LFnu e HFnu). A relação LF/HF reflete o balanço entre os componentes simpático e parassimpático do SNA, caracterizando o balanço

simpatovagal sobre o coração^(19, 25). A outra análise da VFC foi feita no domínio do tempo, calculada a partir da variabilidade entre os pontos dos intervalos RR (VAR RR).

4.9 Análise por Western Blot

Foi medido a expressão proteica da ECA, ECA2, AT1R, AT2R e Mas em homogeneizado do VD. As proteínas foram quantificadas de acordo com a técnica descrita por Lowry e cols. (1951) e utilizadas para normalizar a quantidade de proteína das amostras cardíacas⁽⁶⁴⁾. Quarenta microgramas de proteína incubados com tampão de Laemmli (Tris 0,5 M; SDS 10%; Glicerol 20%; Azul de bromofenol 0,05%; 2-betamercaptoetanol 6%) à 95°C por 2 minutos e em seguida foram expostos à eletroforese de gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE). As proteínas separadas foram transferidas através de eletroforese para membranas PVDF (Immobilon – P Milipore[®]) usando tampão contendo Tris base 48 mmol/L, glicina 39 mmol/L, metanol 10%, pH 8,9. As membranas foram então bloqueadas por uma hora em leite desnatado 1% em tampão TBS-tween (Tris 20 mM, NaCl 140 mM, Tween 20 0,05%). As membranas foram processadas por imunodeteção, usando-se os seguintes anticorpos primários: anticorpo anti-ECA2 de coelho (Abcam[®], Cambridge, Massachusetts, USA), anticorpo monoclonal anti-ECA de camundongo (Millipore[®], Billerica, Massachusetts, EUA), anticorpo anti-AT1R de coelho (Alomone[®], Jerusalém, Israel), anticorpo anti-AT2R de coelho (Alomone[®], Jerusalém, Israel) e anticorpo anti-Mas de coelho (Alomone[®], Jerusalém, Israel). Os resultados de cada membrana foram normalizadas através do método de Ponceau red⁽⁶⁵⁾. Os anticorpos primários foram detectados usando anticorpos secundários de acordo com a origem dos primários, anti-coelho ou anti-camundongo, (Santa Cruz Biotechnology[®], Santa Cruz, CA, USA e Amersham Pharmacia Biotech[®] do Brasil LTDA, São Paulo, SP, Brasil). As membranas foram expostas a um filme de RX (Hyperfilm[®] – Amersham, UK) durante 30-60 segundos utilizando-se um Kit-ECL. Após esse período o filme foi revelado e fixado. As bandas foram quantitativamente analisadas no densitômetro de imagem (Imagemaster VDS CI[®], Amersham Biosciences, Europe, IT)^(65, 66).

4.10 Análise estatística

Os dados foram comparados por ANOVA de duas vias prevendo a interação entre os efeitos do tratamento com MCT e do exercício seguida pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

5. RESULTADOS

5.1 Parâmetros Morfométricos e Hemodinâmicos

Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao peso total corporal inicial e final. Porém, o peso do VD, o grupo MCT-S foi significativamente maior do que os demais grupos, assim como na normalização do VD pela tíbia (Tabela 1).

Na PDFVD não foi encontrada diferença significativa. Por outro lado, quando à PSVD, o grupo MCT-S apresentou aumento significativo comparado ao CO (Tabela 2). Nos valores da hemodinâmica sistêmica acessada pelo cateterismo da artéria carótida não houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 3).

O teste de esforço máximo inicial não diferiu significativamente entre os grupos quanto ao tempo de duração. No entanto, no teste final, os grupos treinados apresentaram melhor desempenho, já que houve aumento significativo do tempo de duração do teste (Tabela 4).

Tabela 1. Parâmetros morfométricos.

	CO (n=6)	MCT-S (n=6)	MCT-B (n=6)	MCT-M (n=6)
PESO CORP. INICIAL (g)	182±26	196±15	185±13	184±17
PESO CORP. FINAL (g)	259±42	230±27	245±27	245±31
PESO VD (mg)	150±24	366±142*	198±47	217±28
PESO VE (mg)	594±121	647±114	560±70	570±98
VD/TÍBIA (mg/mm)	4,3±0,7	10,8±4,9*	5,8±1,4	6,2±0,8
VE/TÍBIA (mg/mm)	16,8±3,3	19±4,4	16,3±2	16,3±2

Valores expressos em média ± desvio padrão; VD= Ventrículo Direito; VE= Ventrículo Esquerdo; MCT-sedentários (MCT-S); MCT-treinamento intensidade baixa (MCT-B); MCT-treinamento intensidade moderada (MCT-M); Controle (CO). *P<0,05 versus demais.

Tabela 2. Hemodinâmica do VD.

	CO	MCT-S	MCT-B	MCT-M
PSVD (mmHg)	19±6	37±15 [#]	22±10	27±5
PDFVD (mmHg)	3±3	4±1	3±7	5±1

Valores expressos em média \pm desvio padrão; PSVD = Pressão Sistólica no Ventrículo Direito; PDFVD = Pressão Diastólica Final do Ventrículo Direito; Controle (CO); MCT-sedentários (MCT-S); MCT-treinamento intensidade baixa (MCT-B); MCT-treinamento intensidade moderada (MCT-M). # $P < 0,05$ vs CO.

Tabela 3. Hemodinâmica sistêmica (medida na artéria carótida).

	CO	MCT-S	MCT-B	MCT-M
PAS (mmHg)	117 \pm 10	96 \pm 25	106 \pm 18	100 \pm 18
PAD (mmHg)	86 \pm 8	64 \pm 25	80 \pm 16	76 \pm 12
PAM (mmHg)	96 \pm 8	74 \pm 24	88 \pm 16	84 \pm 14
FC (bpm)	290 \pm 35	283 \pm 114	321 \pm 98	315 \pm 56

Valores expressos em média \pm desvio padrão; PAS = Pressão Arterial Sistólica; PAD = Pressão Arterial Diastólica; PAM = Pressão Arterial Média; FC = Frequência Cardíaca; Controle (CO); MCT-sedentários (MCT-S); MCT-treinamento intensidade baixa (MCT-B); MCT-treinamento intensidade moderada (MCT-M). Não houve diferença estatisticamente significativa.

Tabela 4. Testes de esforço máximo.

	CO	MCT-S	MCT-B	MCT-M
TESTE INICIAL (s)	892 \pm 316	1221 \pm 637	1091 \pm 343	1077 \pm 201
TESTE FINAL (s)	874 \pm 499	809 \pm 367 [¶]	1268 \pm 399	1644 \pm 263

Valores expressos em média \pm desvio padrão; Controle (CO); MCT-sedentários (MCT-S); MCT-treinamento intensidade baixa (MCT-B); MCT-treinamento intensidade moderada (MCT-M).

[¶] $P < 0,05$ vs MCT-M e MCT-B.

5.2 Controle Autonômico

Os componentes LFa e LFnu nos grupos treinados foram significativamente menores do que no grupo MCT-S. Por outro lado, no grupo MCT-S esses parâmetros foram significativamente ($P < 0,05$) maiores do que no grupo CO (Figura 1). Além disso, o componente HFa, que representa a participação parassimpática, foi estatisticamente maior nos grupos MCT-B e MCT-M comparado com o CO e no grupo sedentário (MCT-S) comparado ao MCT-B (figura 1). O HF normalizado foi significativamente menor no grupo MCT-S quando comparado com os grupos treinados e com o grupo CO (figura 1). Não houve diferença estatística na frequência cardíaca (bpm: CO=290 \pm 35; MCT-

S=283±114; MCT-B=321±110 e MCT-M=315±56). A VAR RR no grupo MCT-S foi estatisticamente menor que os grupos treinados e CO (Figura 2). Ainda nessa variável o grupo MCT-B foi significativamente maior que o grupo CO (Figura 2). Na relação LF/HF não foram encontrados resultados significativamente diferentes (Figura 3).

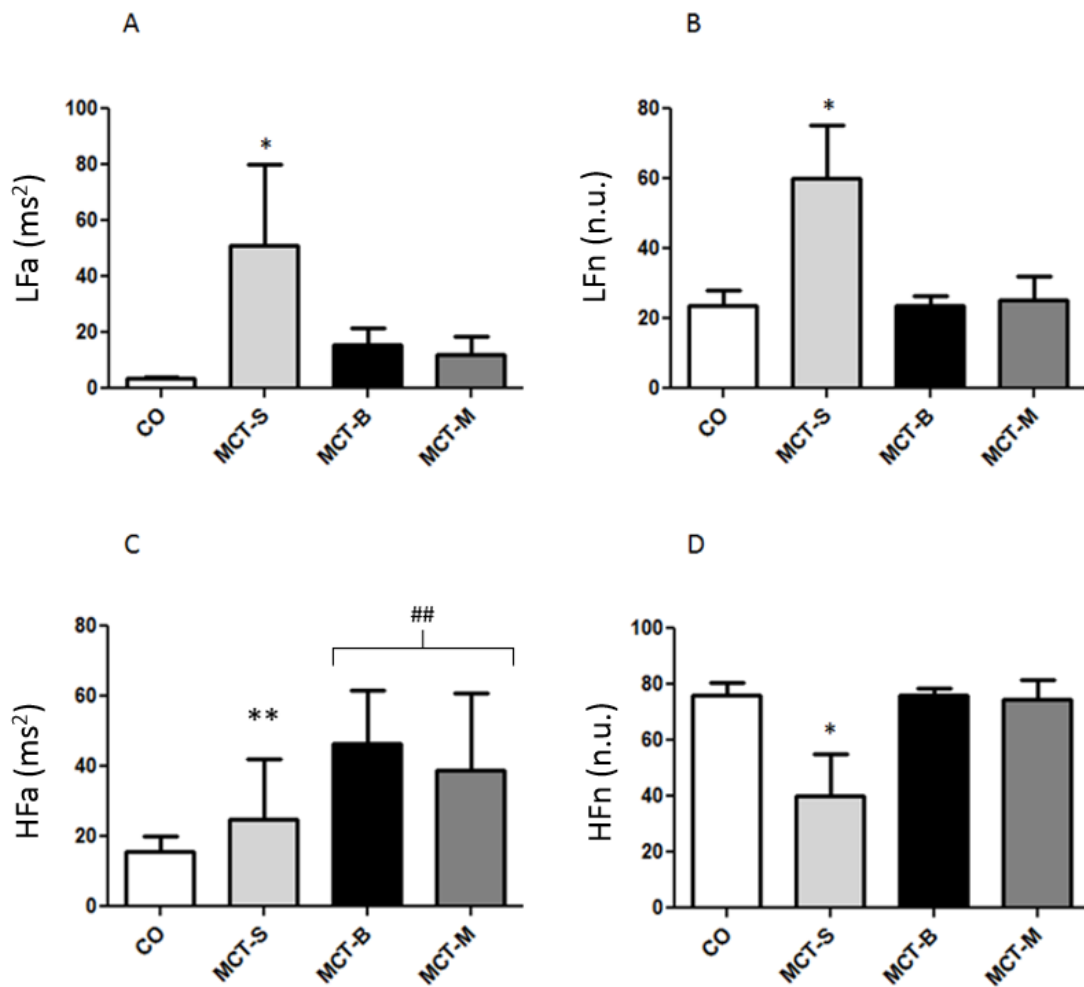


Figura 1: Análise espectral do controle autônomo no domínio da frequência. Painel A: LFa = Valores absolutos do componente de baixa frequência (ms²); Painel B: LFn = Valores normalizados do componente de baixa frequência (%); Painel C: HFa = Valores absolutos do componente de alta frequência (ms²); Painel D: HFnu = Valores normalizados do componente de alta frequência (%); MCT-sedentários (MCT-S); MCT-treinamento intensidade baixa (MCT-B); MCT-treinamento intensidade moderada (MCT-M); Controle (CO). Os dados foram comparados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey (P<0,05). Valores expressos em média ± desvio padrão; *P<0,05 MCT-S vs demais; **P<0,05 vs MCT-B; ##P<0,05, MCT-M e MCT-B vs CO.

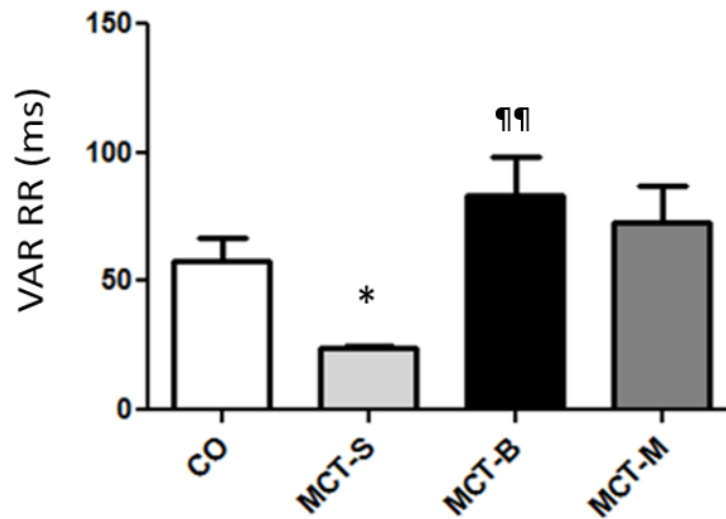


Figura 2: Análise da variabilidade da frequência cardíaca do controle autonômico no domínio do tempo VA RR= Variabilidade dos intervalos RR (ms); MCT-sedentários (MCT-S); MCT-treinamento intensidade baixa (MCT-B); MCT-treinamento intensidade moderada (MCT-M); Controle (CO). Os dados foram comparados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Valores expressos em média \pm desvio padrão; * $P < 0,05$, MCT-S vs demais; ¶ $P < 0,05$, MCT-B vs CO.

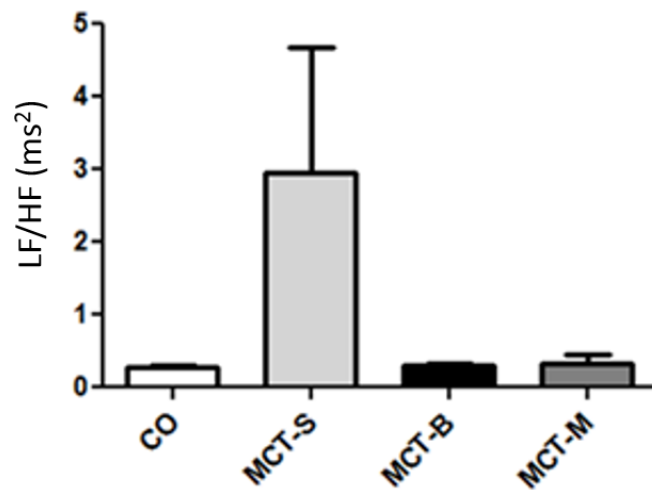


Figura 3: Análise do controle autonômico pelo balanço simpato-vagal. LF/HF= Low Frequency/High Frequency (ms²); MCT-sedentários (MCT-S); MCT-treinamento intensidade baixa (MCT-B); MCT-treinamento intensidade moderada (MCT-M); Controle (CO). Os dados foram comparados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey (P<0,05). Valores expressos em média ± desvio padrão; Não houve diferença estatisticamente significativa.

5.3 Expressão proteica

A técnica de Western Blot, realizada em homogeneizados do VD, mostrou que o exercício físico reduziu significativamente a expressão da ECA em relação aos animais sedentários (figura 4). Quanto à ECA2, todos os grupos apresentaram valor significativamente maiores que o grupo CO. O grupo MCT-M apresentou aumento significativo de ECA2 em relação a todos os outros grupos (figura 5). Em relação à expressão dos receptores AT1R, AT2R e Mas, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (figuras 6, 7 e 8).

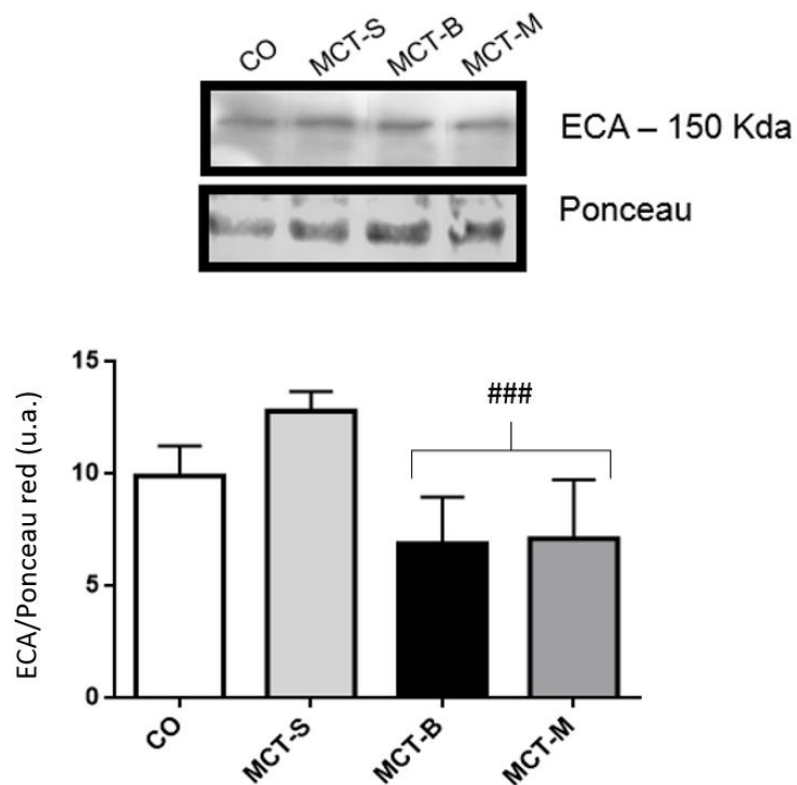


Figura 4: Expressão proteica de enzima conversora de angiotensina no ventrículo direito ECA = Enzima conversora de angiotensina (u.a.); MCT-sedentários (MCT-S); MCT-treinamento intensidade baixa (MCT-B); MCT-treinamento intensidade moderada (MCT-M); Controle (CO). Os dados foram comparados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Valores expressos em média \pm desvio padrão; ### $P < 0,0001$, MCT-B e MCT-M vs demais.

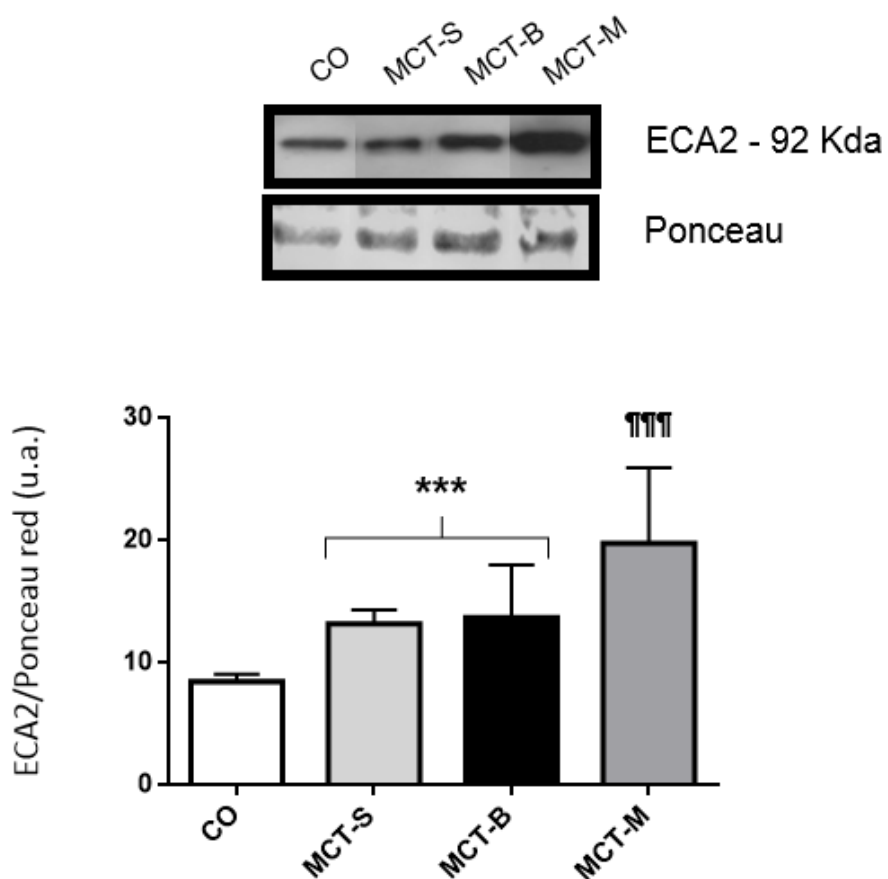


Figura 5: Expressão proteica de enzima conversora de angiotensina 2 no ventrículo direito. ECA2 = Enzima conversora de angiotensina 2 (u.a.); MCT-sedentários (MCT-S); MCT-treinamento intensidade baixa (MCT-B); MCT-treinamento intensidade moderada (MCT-M); Controle (CO). Os dados foram comparados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Valores expressos em média \pm desvio padrão; *** $P < 0,05$, MCT-S e MCT-B vs CO; #### $P < 0,0001$, MCT-M vs demais.

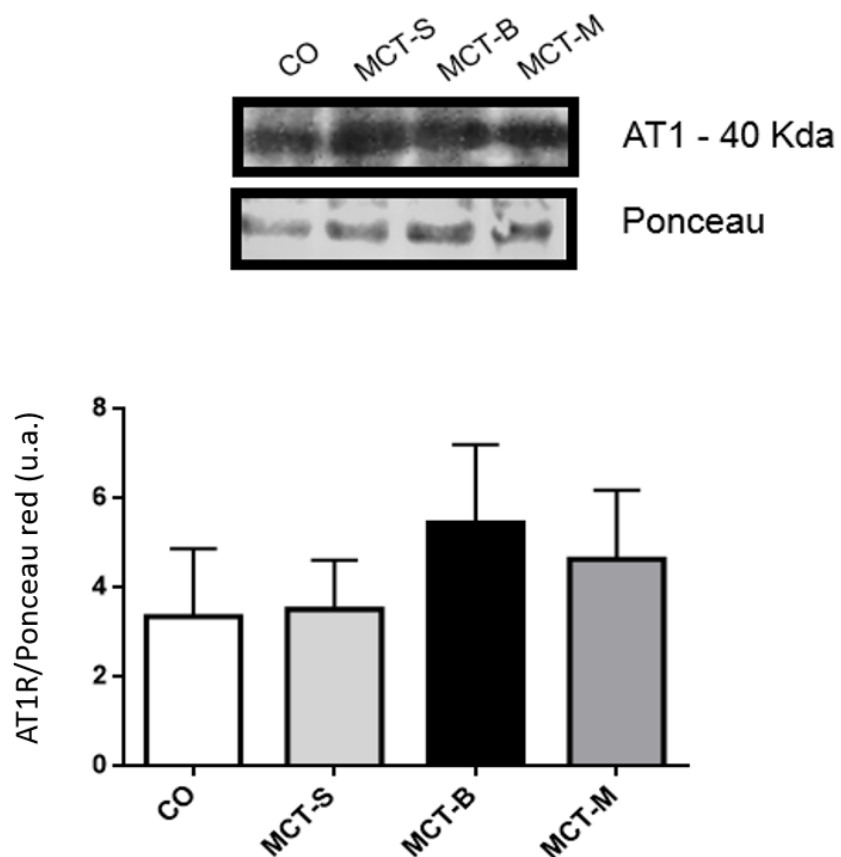


Figura 6: Expressão proteica de receptor de angiotensina II do tipo 1 no ventrículo direito. AT1R = Receptor de Angiotensina II do tipo 1 (u.a.); MCT-sedentários (MCT-S); MCT-treinamento intensidade baixa (MCT-B); MCT-treinamento intensidade moderada (MCT-M); Controle (CO). Os dados foram comparados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Valores expressos em média \pm desvio padrão; Não houve diferença significativa entre os grupos.

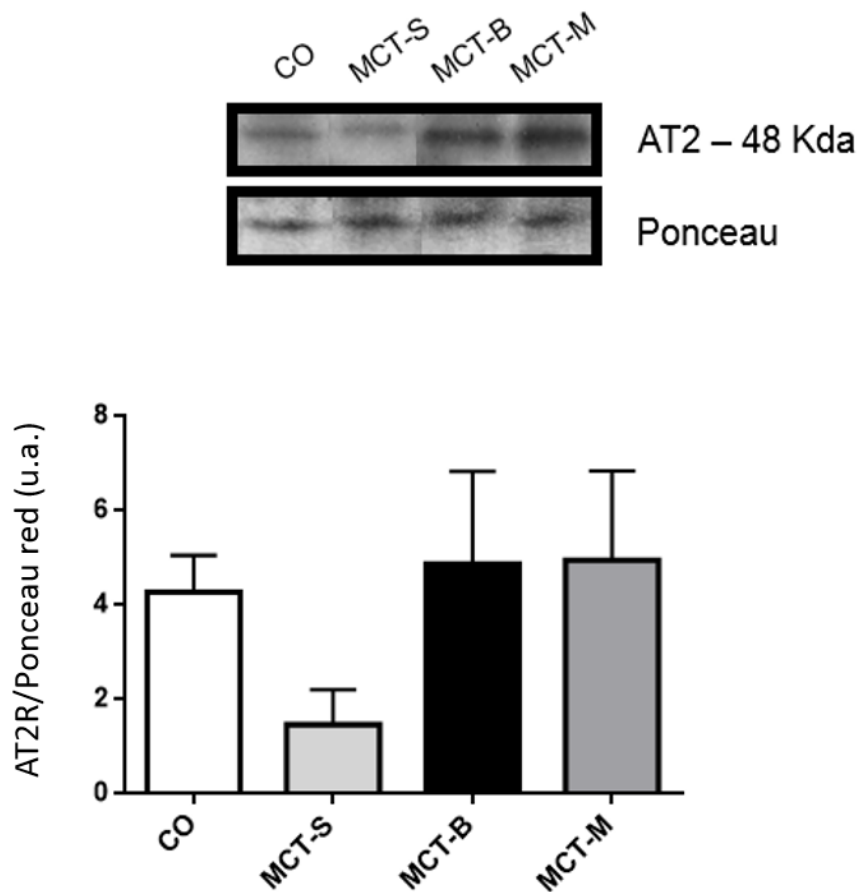


Figura 7: Expressão proteica de receptor de angiotensina II do tipo 2 no ventrículo direito. AT2R = Receptor de Angiotensina II do tipo 2 (u.a.); MCT-sedentários (MCT-S); MCT-treinamento intensidade baixa (MCT-B); MCT-treinamento intensidade moderada (MCT-M); Controle (CO). Os dados foram comparados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Valores expressos em média \pm desvio padrão; Não houve diferença entre os grupos.

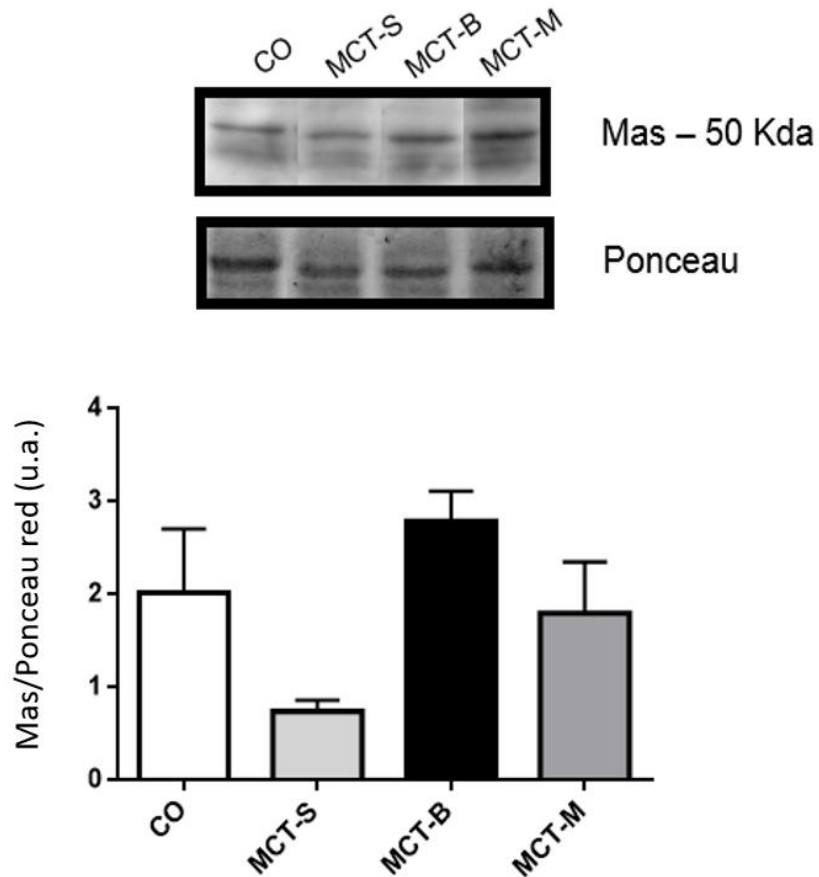


Figura 8: Expressão proteica de receptor de angiotensina (1-7) no ventrículo direito. Mas = Receptor de Angiotensina-(1-7) (u.a.); MCT-sedentários (MCT-S); MCT-treinamento intensidade baixa (MCT-B); MCT-treinamento intensidade moderada (MCT-M); Controle (CO). Os dados foram comparados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Valores expressos em média \pm desvio padrão; Não houve diferença entre os grupos.

6. DICUSSÃO

As observações mais significantes do presente estudo foram que o exercício aumentou a VFC, diminuiu a expressão da ECA e aumentou da ECA2 no VD, indicando uma atenuação da progressão da HP.

Nossos resultados mostraram que o treinamento aeróbico foi eficaz na redução da hipertrofia do VD decorrente da HP por MCT (50 mg/kg). O treinamento reduziu significativamente o peso do VD em relação aos animais sedentários. Esses resultados concordam com aqueles encontrados no estudo de Souza-Rabo et al. (2008) que, apesar de utilizarem uma dose mais elevada de MCT (60 mg/Kg), mas com o mesmo tempo de atividade física, encontraram uma atenuação na hipertrofia do VD em ratos Wistar⁽⁶⁷⁾. Os resultados desse estudo corroboram com os nossos resultados de PSVD, que também mostraram ausência de diferença significativa entre os grupos exercitados e controle. Por outro lado houve aumento significativo deste parâmetro no grupo MCT-S.

Ainda, segundo Prior et al. (2004), o exercício aeróbico modula respostas hemodinâmicas, provavelmente devido à angiogênese e à melhoria na morfologia dos vasos arteriais⁽⁴⁷⁾, o que poderia explicar a redução da pressão e da hipertrofia do VD, conforme demonstrado em nosso estudo.

Por outro lado, o estudo de Colombo et al. (2013), utilizando uma dose única de 60 mg/kg de MCT, não mostrou redução na PVSD dos ratos⁽⁶⁸⁾. Os autores afirmam que a ausência de modificação nesse parâmetro foi provavelmente uma resposta adaptativa no intuito de aumentar o débito cardíaco para manter o fluxo sanguíneo pulmonar.

No entanto, os resultados do teste de esforço máximo estão de acordo com o conjunto dos nossos achados e indicam uma melhora da capacidade funcional, nos grupos treinados. Considerando a provável melhoria da condição contrátil tanto dos músculos respiratórios quanto cardiocirculatórios, é provável que as adaptações promovidas pelo treinamento físico tenham melhorado também a captação e a distribuição de oxigênio nos animais com HP.

Com relação aos componentes LFa e HFa, seria de se esperar que os grupos tratados com MCT apresentassem valores menores do que o grupo CO. No entanto, em desacordo com dados anteriores já publicados do nosso laboratório⁽²²⁾, essa expectativa não se confirmou. É possível que este resultado

se deva a diferença entre as cepas dos ratos utilizados nos dois estudos. Rigatto et al (2013) utilizaram ratos Sprague-Dawley, e neste estudo utilizamos ratos Wistar. Além disso, a anestesia utilizada nos dois estudos não foi a mesma. Rigatto et al. (2013) acrescentaram diazepam ao anestésico⁽²²⁾. A combinação desses dois fatores pode ter provocado algumas diferenças nos resultados.

No entanto, considerando os resultados de LF e HF normalizados, que representam a proporcionalidade entre os dois sistemas, o grupo MCT-S mostrou aumento significativo do componente LFnu, ou simpático, e diminuição significativa do HFnu, ou parassimpático, em relação aos demais grupos. De fato, tanto resultado em humanos⁽⁶⁹⁾ quanto em ratos^{(22), (70)} concordam com nossos achados que demonstraram um desequilíbrio entre os componentes simpático e parassimpático. De fato, houve um predomínio da modulação simpática acompanhada de uma diminuição significativa da participação do parassimpático nos animais sedentários. Além disso, há também um aumento da atividade dos nervos simpáticos em pacientes com HP⁽²⁴⁾. Esta atividade está fortemente associada à progressão da insuficiência cardíaca e à intolerância ao exercício⁽⁷¹⁾, demonstrando a importância do equilíbrio simpatovagal para deter o avanço da doença.

O efeito do exercício sobre a modulação autonômica na hipertensão é também claramente evidenciada no estudo de Bertagnolli et al. (2008)⁽²⁹⁾ em ratos, e por Pagani et al. (1988)^(29, 72) em pacientes, onde ficou demonstrado que o balanço simpatovagal é uma mudança adaptativa promovida pelo exercício.

Mesmo considerando que o balanço simpatovagal, representado pela relação LF/HF, não diferiu significativamente entre os grupos nesse estudo, é razoável acreditar que, em conjunto, os resultados encontrados para os componentes LF e HF indicam que o exercício foi benéfico no sentido de melhorar o funcionamento autonômico. Houve uma visível aproximação dos valores de LF/HF nos grupos treinados ao grupo CO, o que fisiologicamente pode representar um benefício não detectado pela análise estatística. Está claro na literatura que existe uma associação entre risco cardiovascular e o balanço autonômico^(73, 74). À semelhança da PA, que a cada diminuição de 1 mmHg há uma redução proporcional no risco para eventos cardiovasculares⁽²²⁾, podemos inferir que também uma melhora no balanço autonômico possa ser importante na sobrevivência do paciente. Possivelmente o grande desvio padrão das respostas

encontradas na HP para esse parâmetro representam uma barreira para a detecção de significância quando o tamanho amostral não é generoso. Se observarmos o grupo sedentário veremos que houve um aumento na relação LF/HF, o que demonstra um predomínio da participação simpática no sistema cardiovascular na HP.

Swedberg et al. (2005), por exemplo, estudando insuficiência cardíaca esquerda, demonstraram um aumento da atividade simpática nessa condição e, quando bloqueavam o simpático, observaram melhora nos sintomas, na função cardíaca e no prognóstico dos pacientes⁽⁷⁵⁾. Em conjunto, esses resultados demonstram a importância de diminuir a ativação simpática, mesmo quando as diferenças não são significativas.

Nos nossos resultados, o impacto da redução significativa da modulação simpática, observada nos grupos exercitados em comparação aos grupos sedentários, fica bem demonstrada pelo aumento significativo na VFC nos grupos MCT-B e MCT-M. De fato, Pagani et al. (1988) afirmaram que um dos maiores efeitos do treinamento físico é representado por um aumento da VFC⁽⁷²⁾, exatamente como encontrado nos nossos resultados. O aumento da VFC nos grupos treinados é de suma importância, pois quanto maior essa variabilidade, menor é o risco para doenças cardiovasculares e ocorrência de eventos que podem culminar com a morte^(20, 21).

Outra observação importante é que o treinamento de baixa intensidade se mostrou mais eficaz em aumentar a VFC do que o treinamento de moderada intensidade. Uma possível razão para explicar esse resultado seria a dificuldade dos animais submetidos ao um protocolo mais exigente em termos aeróbicos, moderada versus baixa, de adaptar a capacidade do pulmão em captar oxigênio em comparação à necessidade de oxigênio e à capacidade do sistema cardiocirculatório para distribuí-lo. Esse foi o primeiro estudo que avaliou o efeito de duas intensidades de exercício aeróbico sobre a VFC de ratos com HP.

Uma das limitações do nosso estudo que deve se considerar é a anestesia. Os animais foram registrados ainda anestesiados com a combinação de cetamina e xilazina. Segundo Svorc et al. (2013) essa combinação influencia o sistema cardiovascular pois a xilazina, por ser um α_2 agonista, é conhecida por aumentar a atividade parassimpática e diminuir a atividade simpática⁽⁷⁶⁾. Por outro lado a cetamina promove estimulação cardiovascular pois diminui o tônus

vagal⁽⁷⁷⁻⁷⁹⁾. Dessa forma, a combinação anestésica proporciona uma redução do impacto desses fármacos separadamente. Ainda assim, provavelmente a anestesia tenha interferido na magnitude das respostas encontradas, especialmente na modulação simpática e parassimpática em valores absolutos. No entanto, é preciso considerar a priori que todos os grupos estavam sob a mesma anestesia durante os registros, de forma que se alguma diferença foi detectada, provavelmente não se deve ao seu efeito.

Quanto à expressão da ECA, houve redução significativa nos grupos que praticaram exercício físico em relação ao grupo sedentário e ao CO. Esse achado vai ao encontro do estudo de Fernandes et al, que encontraram redução da expressão da ECA no ventrículo esquerdo quando ratas wistar praticaram exercício físico aeróbico de baixa intensidade⁽⁴⁵⁾. Essa enzima tem duas funções primordiais que são a conversão Angiotensina I em Ang II e a destruição da bradicinina^(34, 80). A redução da expressão da ECA tem como consequência a redução de Ang II, um potente vasoconstritor, e ainda aumento da bradicinina, um potente vasodilatador. Em conjunto, a redução da ECA contribui significativamente para a redução da pressão ventricular. Essa conclusão é reforçada pela atenuação da hipertrofia do VD, redução da PSVD e pela melhora da modulação do sistema nervoso autônomo, vista pelo aumento da VFC, naqueles grupos que praticaram exercício físico.

Com relação à expressão da ECA2, observamos que houve aumento significativo em todos os grupos em relação ao CO. No grupo MCT-M houve a maior aumento neste parâmetro, tornando esta intensidade diferente de todos os demais grupos. Esse predomínio do eixo ECA2 no VD após exercício foi também descrito por Barretti et al (2012), que submeteram ratos controles e obesos à um protocolo de natação e verificaram um aumento da ECA2 nos dois grupos treinados, quando comparados aos seus respectivos grupos sedentários⁽⁸¹⁾. Da mesma forma, o aumento da expressão da ECA2 na doença é confirmado por Burrell et al (2005)⁽⁸²⁾ em ratos infartados e, Zisman et al. (2003) e Goulter et al. (2004) em humanos com insuficiência cardíaca, observaram aumento significativo dessa enzima^(83, 84). É possível que o organismo promova uma compensação, aumentando assim, os componentes que favorecem o predomínio do eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas. Possivelmente, mais importante do que seus valores absolutos, o predomínio de um ou de outro eixo, e de suas

respectivas ações fisiológicas, pode representar maior ou menor benefício para o sistema cardiovascular. Importante salientar que todos os grupos apresentaram expressão da ECA2 significativamente maior do que o controle. Esse resultado demonstra uma possível adaptação desse sistema na HP.

Em relação à expressão do receptor Mas, dados da literatura⁽⁸⁵⁾ demonstram que o treinamento aeróbico promoveu o aumento desse receptor de coração de ratos hipertensos. Esse resultado não foi observado em nosso estudo, apesar da expressão ter sido menor no grupo sedentário e ter aumentado no grupo que praticou exercício em intensidade baixa.

Além disso, ao analisarmos a expressão do AT1R e do AT2R, não encontramos diferença significativa entre os grupos. Adamy et al. (2002), analisando corações de ratos com HP por MCT (60 mg/kg), não encontraram diferença significativa na expressão do receptor AT1R⁽⁸⁶⁾. Esses resultados estão parcialmente em acordo com Barretti et al (2012) que, ao realizarem exercício físico em ratos controles e obesos, não observaram diferença significativa no AT1R no coração de ratos controles treinados *versus* sedentários, mas observaram redução do AT2R no grupo obeso treinado quando comparado ao não treinado⁽⁸¹⁾. No entanto, Fernandes et al. (2011) encontraram aumento da expressão do AT1R e do AT2R no coração de ratas após protocolo de exercício físico aeróbico⁽⁴⁵⁾. Guimarães et al (2012) também encontraram aumento do AT1R e creditam isso à redução da Ang II provocada pelo exercício físico⁽⁸⁷⁾.

Em conjunto, esses resultados reforçam que, mais do que a expressão isolada dos receptores ou das enzimas, é o conjunto dos achados que determinam o efeito fisiológico dado pelo balanço entre os eixos vasoconstritor e vasodilatador. O resultado desse balanço vai influenciar as respostas adequadas do organismo frente aos desafios para manter a homeostasia.

Nossos resultados não demonstraram diferença significativa entre os eixos vasodilatador e vasoconstritor do SRA nos diferentes grupos. No entanto, foi possível evidenciar um aumento do tempo de duração do teste de esforço máximo, atenuação da PSVD e na redução da hipertrofia do VD, no aumento da VFC, na redução da modulação simpática e no aumento da vagal nos grupos treinados, demonstrando uma melhora nas respostas adaptativas nos animais treinados.

Por fim, está bem claro na literatura a complexidade do SRA. Nos últimos 10 anos, com o avanço de técnicas de espectrometria foi possível identificar novos peptídeos desse sistema⁽⁸⁸⁾, como é o caso da Angiotensina A⁽⁸⁹⁾ e da Alamandina⁽⁹⁰⁻⁹²⁾. Sendo assim, mais estudos serão necessários para demonstrar a real magnitude dos efeitos do exercício e de seu mecanismo de ação para melhorar os parâmetros fisiopatológicos numa doença tão complexa como a HP.

7. CONCLUSÃO

Este estudo evidenciou que uma alternativa não farmacológica como o exercício físico aeróbico supervisionado, principalmente o de baixa intensidade, pode melhorar parâmetros como VFC, melhora da modulação parassimpática e redução da simpática para o coração, equilíbrio entre as enzimas ECA e ECA2 do SRA e ainda diminuir a PSVD e atenuar a hipertrofia do VD. Coletivamente, esses efeitos podem contribuir para a redução do risco para evento cardiovascular nesses animais com HP.

8. REFERÊNCIAS

1. Berne R, Levy M. Fisiologia. 6 ed: Elsevier; 2011. p. 844.
2. Farhat MY, Chen MF, Bhatti T, Iqbal A, Cathapermal S, Ramwell PW. Protection by oestradiol against the development of cardiovascular changes associated with monocrotaline pulmonary hypertension in rats. *Br J Pharmacol.* 1993;110(2):719-23.
3. Rich S. Primary Pulmonary Hypertension. *Progress in Cardiovascular Diseases*(November/December), 1988. p. 205-38.
4. Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 1997;336(2):111-7.
5. Bagshaw RJ, Cox RH. Pulmonary vascular response is dependent upon initial state of the vasculature. *Anesthesiology.* 1983;58(2):205-6.
6. Cox RH. Comparison of mechanical and chemical properties of extra- and intralobar canine pulmonary arteries. *Am J Physiol.* 1982;242(2):H245-53.
7. Bradford CN, Ely DR, Raizada MK. Targeting the vasoprotective axis of the renin-angiotensin system: a novel strategic approach to pulmonary hypertensive therapy. *Curr Hypertens Rep.* 2010;12(4):212-9.
8. Wensel R, Jilek C, Dorr M, Francis DP, Stadler H, Lange T, et al. Impaired cardiac autonomic control relates to disease severity in pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 34. Switzerland2009. p. 895-901.
9. Gerald Simonneau M, Nazzareno Galie` M, Lewis J. Rubin M, David Langleben M, Guido Domenighetti M, Simon Gibbs M, et al. Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. *JACC* June 16, 2004. p. 5–12.
10. Kanu Chatterjee M, Teresa De Marco M, Joseph S. Alpert M. Pulmonary Hypertension Hemodynamic Diagnosis and Management. *Arch Intern Med;* 2002. p. 1925-33.
11. Galie N, Torbicki A, Barst R, Dartevelle P, Haworth S, Higenbottam T, et al. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 25. England2004. p. 2243-78.
12. Bauer R, Dehnert C, Schoene P, Filusch A, Bartsch P, Borst MM, et al. Skeletal muscle dysfunction in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respir Med.* 101. England2007. p. 2366-9.

13. Fuster V, Steele PM, Edwards WD, Gersh BJ, McGoon MD, Frye RL. Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis. *Circulation*. 1984;70(4):580-7.
14. Rozkovec A, Montanes P, Oakley CM. Factors that influence the outcome of primary pulmonary hypertension. *Br Heart J*. 1986;55(5):449-58.
15. Rich S, Levy PS. Characteristics of surviving and nonsurviving patients with primary pulmonary hypertension. *Am J Med*. 76. United States 1984. p. 573-8.
16. Vlahakes GJ, Turley K, Hoffman JI. The pathophysiology of failure in acute right ventricular hypertension: hemodynamic and biochemical correlations. *Circulation*. 1981;63(1):87-95.
17. Sibbald WJ, Driedger AA. Right ventricular function in acute disease states: pathophysiologic considerations. *Crit Care Med*. 1983;11(5):339-45.
18. Guyton ACH, John E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 10 ed.
19. Kleiger RE, Stein PK, Bigger JT, Jr. Heart rate variability: measurement and clinical utility. *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 10. United States 2005. p. 88-101.
20. dos Reis AF, Bastos BG, Mesquita ET, Romeo Filho LJ, da Nobrega AC. [Parasympathetic dysfunction, heart rate variability and cholinergic stimulation after acute myocardial infarction]. *Arq Bras Cardiol*. 1998;70(3):193-9.
21. Perlini S, Palladini G, Ferrero I, Tozzi R, Fallarini S, Facchetti A, et al. Sympathectomy or doxazosin, but not propranolol, blunt myocardial interstitial fibrosis in pressure-overload hypertrophy. *Hypertension*. 46. United States 2005. p. 1213-8.
22. Rigatto K, Casali KR, Shenoy V, Katovich MJ, Raizada MK. Diminazene aceturate improves autonomic modulation in pulmonary hypertension. *Eur J Pharmacol*. 2013;713(1-3):89-93.
23. Ciarka A, Vachiery JL, Houssiere A, Gujic M, Stoupel E, Velez-Roa S, et al. Atrial septostomy decreases sympathetic overactivity in pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 131. United States 2007. p. 1831-7.
24. Velez-Roa S, Ciarka A, Najem B, Vachiery JL, Naeije R, van de Borne P. Increased sympathetic nerve activity in pulmonary artery hypertension. *Circulation*. 110. United States 2004. p. 1308-12.

25. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation*. 1996;93(5):1043-65.
26. Murad K, Brubaker PH, Fitzgerald DM, Morgan TM, Goff DC, Jr., Soliman EZ, et al. Exercise training improves heart rate variability in older patients with heart failure: a randomized, controlled, single-blinded trial. *Congest Heart Fail*. 2012;18(4):192-7.
27. Oliveira NL, Ribeiro F, Alves AJ, Teixeira M, Miranda F, Oliveira J. Heart rate variability in myocardial infarction patients: effects of exercise training. *Rev Port Cardiol*. 2013;32(9):687-700.
28. Brum PC, Bacurau AV, Medeiros A, Ferreira JC, Vanzelli AS, Negrao CE. Aerobic exercise training in heart failure: impact on sympathetic hyperactivity and cardiac and skeletal muscle function. *Braz J Med Biol Res*. 44. Brazil2011. p. 827-35.
29. Pagani M, Somers V, Furlan R, Dell'Orto S, Conway J, Baselli G, et al. Changes in autonomic regulation induced by physical training in mild hypertension. *Hypertension*. 1988;12(6):600-10.
30. Grassi G, Cattaneo BM, Seravalle G, Lanfranchi A, Pozzi M, Morganti A, et al. Effects of chronic ACE inhibition on sympathetic nerve traffic and baroreflex control of circulation in heart failure. *Circulation*. 1997;96(4):1173-9.
31. Grassi G. Renin-angiotensin-sympathetic crosstalks in hypertension: reappraising the relevance of peripheral interactions. *J Hypertens*. 2001;19(10):1713-6.
32. TIGERSTEDT R, P. G. B. Niere und Kreislauf. *Scandinavian Archives of Physiology*1898. p. 223-71.
33. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8258-63.
34. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med*. 264. England2008. p. 224-36.
35. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*. 2000;87(5):E1-9.

36. Grobe JL, Mecca AP, Lingis M, Shenoy V, Bolton TA, Machado JM, et al. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292. United States 2007. p. H736-42.
37. Hamming I, Cooper ME, Haagmans BL, Hooper NM, Korstanje R, Osterhaus AD, et al. The emerging role of ACE2 in physiology and disease. *J Pathol*. 2007;212(1):1-11.
38. Galie N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 34. Switzerland 2009. p. 1219-63.
39. Runo JR, Loyd JE. Primary pulmonary hypertension. *Lancet*. 361. England 2003. p. 1533-44.
40. Hernandez Prada JA, Ferreira AJ, Katovich MJ, Shenoy V, Qi Y, Santos RA, et al. Structure-based identification of small-molecule angiotensin-converting enzyme 2 activators as novel antihypertensive agents. *Hypertension*. 51. United States 2008. p. 1312-7.
41. Ferreira AJ, Shenoy V, Yamazato Y, Sriramula S, Francis J, Yuan L, et al. Evidence for angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for the prevention of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179(11):1048-54.
42. Silva DM, Gomes-Filho A, Olivon VC, Santos TM, Becker LK, Santos RA, et al. Swimming training improves the vasodilator effect of angiotensin-(1-7) in the aorta of spontaneously hypertensive rat. *J Appl Physiol* (1985). 111. United States 2011. p. 1272-7.
43. Sullivan JC, Bhatia K, Yamamoto T, Elmarakby AA. Angiotensin (1-7) receptor antagonism equalizes angiotensin II-induced hypertension in male and female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2010;56(4):658-66.
44. Shah A, Oh YB, Lee SH, Lim JM, Kim SH. Angiotensin-(1-7) attenuates hypertension in exercise-trained renal hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 302. United States 2012. p. H2372-80.
45. Fernandes T, Hashimoto NY, Magalhaes FC, Fernandes FB, Casarini DE, Carmona AK, et al. Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin ii, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension*. 2011;58(2):182-9.

46. Handoko ML, de Man FS, Happe CM, Schaliij I, Musters RJ, Westerhof N, et al. Opposite effects of training in rats with stable and progressive pulmonary hypertension. *Circulation*. 120. United States2009. p. 42-9.
47. Prior BM, Yang HT, Terjung RL. What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol* (1985). 97. United States2004. p. 1119-28.
48. Mereles D, Ehlken N, Kreuzscher S, Ghofrani S, Hoepfer MM, Halank M, et al. Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Circulation*. 114. United States2006. p. 1482-9.
49. Desai SA, Channick RN. Exercise in patients with pulmonary arterial hypertension. *J Cardiopulm Rehabil Prev*. 28. United States2008. p. 12-6.
50. Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, Gielen S, Hamann C, Kaiser R, et al. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 1998;98(24):2709-15.
51. Grunig E, Ehlken N, Ghofrani A, Staehler G, Meyer FJ, Juenger J, et al. Effect of exercise and respiratory training on clinical progression and survival in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Respiration*. 81. Switzerland: Basel.; 2011. p. 394-401.
52. van de Borne P, Montano N, Pagani M, Oren R, Somers VK. Absence of low-frequency variability of sympathetic nerve activity in severe heart failure. *Circulation*. 1997;95(6):1449-54.
53. Yamazato Y, Ferreira AJ, Hong KH, Sriramula S, Francis J, Yamazato M, et al. Prevention of pulmonary hypertension by Angiotensin-converting enzyme 2 gene transfer. *Hypertension*. 2009;54(2):365-71.
54. Shrikrishna D, Astin R, Kemp PR, Hopkinson NS. Renin-angiotensin system blockade: a novel therapeutic approach in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Sci (Lond)*. 123. England2012. p. 487-98.
55. Shenoy V, Qi Y, Katovich MJ, Raizada MK. ACE2, a promising therapeutic target for pulmonary hypertension. *Curr Opin Pharmacol*. 2011;11(2):150-5.
56. Lahiri MK, Kannankeril PJ, Goldberger JJ. Assessment of autonomic function in cardiovascular disease: physiological basis and prognostic implications. *J Am Coll Cardiol*. 51. United States2008. p. 1725-33.

57. Kleiger RE, Miller JP, Bigger JT, Jr., Moss AJ. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 59. United States 1987. p. 256-62.
58. Goldim J, Raymundo M. *Pesquisa em Saúde e os Direitos dos Animais.* 2 ed. Porto Alegre: HCPA; 1997.
59. Ryan J, Bloch K, Archer SL. Rodent models of pulmonary hypertension: harmonisation with the world health organisation's categorisation of human PH. *Int J Clin Pract Suppl.* 2011(172):15-34.
60. Des Tombe AL, Van Beek-Harmsen BJ, Lee-De Groot MB, Van Der Laarse WJ. Calibrated histochemistry applied to oxygen supply and demand in hypertrophied rat myocardium. *Microsc Res Tech.* 2002;58(5):412-20.
61. Sano M, Minamino T, Toko H, Miyauchi H, Orimo M, Qin Y, et al. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature.* 446. England 2007. p. 444-8.
62. Pilis W, Zarzeczny R, Langfort J, Kaciuba-Uscilko H, Nazar K, Wojtyna J. Anaerobic threshold in rats. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol.* 1993;106(2):285-9.
63. Waynforth HBF, Paul. *Experimental and Surgical Techniques in the Rat.* London: Academic Press; 1992.
64. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
65. Klein D, Kern RM, Sokol RZ. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Biochem Mol Biol Int.* 1995;36(1):59-66.
66. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
67. Souza-Rabbo MP, Silva LF, Auzani JA, Picoral M, Khaper N, Bello-Klein A. Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 35. Australia 2008. p. 944-8.
68. Colombo R, Siqueira R, Becker CU, Fernandes TG, Pires KM, Valenca SS, et al. Effects of exercise on monocrotaline-induced changes in right heart function and pulmonary artery remodeling in rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2013;91(1):38-44.

69. Ciarka A, Doan V, Velez-Roa S, Naeije R, van de Borne P. Prognostic significance of sympathetic nervous system activation in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 181. United States 2010. p. 1269-75.
70. Sanyal SN, Ono K. Derangement of autonomic nerve control in rat with right ventricular failure. *Pathophysiology.* 8 2002. p. 197-203.
71. Fauchier L, Melin A, Eder V, Antier D, Bonnet P. Heart rate variability in rats with chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Ann Cardiol Angeiol (Paris).* 55. France 2006. p. 249-54.
72. Bertagnolli M, Schenkel PC, Campos C, Mostarda CT, Casarini DE, Bello-Klein A, et al. Exercise training reduces sympathetic modulation on cardiovascular system and cardiac oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 21. United States 2008. p. 1188-93.
73. Tsuji H, Venditti FJ, Jr., Manders ES, Evans JC, Larson MG, Feldman CL, et al. Reduced heart rate variability and mortality risk in an elderly cohort. The Framingham Heart Study. *Circulation.* 1994;90(2):878-83.
74. Dekker JM, Schouten EG, Klootwijk P, Pool J, Swenne CA, Kromhout D. Heart rate variability from short electrocardiographic recordings predicts mortality from all causes in middle-aged and elderly men. The Zutphen Study. *Am J Epidemiol.* 1997;145(10):899-908.
75. Swedberg K, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, Komajda M, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 26. England 2005. p. 1115-40.
76. Svorc P, Jr., Bacova I, Svorc P, Buzga M. Autonomic nervous system under ketamine/ xylazine and pentobarbital anaesthesia in a Wistar rat model: a chronobiological view. *Prague Med Rep.* 114. Czech Republic 2013. p. 72-80.
77. Haskins SC, Farver TB, Patz JD. Cardiovascular changes in dogs given diazepam and diazepam-ketamine. *Am J Vet Res.* 1986;47(4):795-8.
78. Haskins SC, Farver TB, Patz JD. Ketamine in dogs. *Am J Vet Res.* 1985;46(9):1855-60.
79. Haskins SC, Patz JD, Farver TB. Xylazine and xylazine-ketamine in dogs. *Am J Vet Res.* 1986;47(3):636-41.

80. Moon JY. Recent Update of Renin-angiotensin-aldosterone System in the Pathogenesis of Hypertension. *Electrolyte Blood Press.* 2013;11(2):41-5.
81. Barretti DL, Magalhaes Fde C, Fernandes T, do Carmo EC, Rosa KT, Irigoyen MC, et al. Effects of aerobic exercise training on cardiac renin-angiotensin system in an obese Zucker rat strain. *PLoS One.* 2012;7(10):e46114.
82. Burrell LM, Risvanis J, Kubota E, Dean RG, MacDonald PS, Lu S, et al. Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans. *Eur Heart J.* 2005;26(4):369-75; discussion 22-4.
83. Zisman LS, Keller RS, Weaver B, Lin Q, Speth R, Bristow MR, et al. Increased angiotensin-(1-7)-forming activity in failing human heart ventricles: evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme Homologue ACE2. *Circulation.* 2003;108(14):1707-12.
84. Goulter AB, Goddard MJ, Allen JC, Clark KL. ACE2 gene expression is up-regulated in the human failing heart. *BMC Med.* 2004;2:19.
85. Dias-Peixoto MF, Ferreira AJ, Almeida PW, Braga VB, Coutinho DC, Melo DS, et al. The cardiac expression of Mas receptor is responsive to different physiological and pathological stimuli. *Peptides.* 35. United States: 2012 Elsevier Inc; 2012. p. 196-201.
86. Adamy C, Oliviero P, Eddahibi S, Rappaport L, Samuel JL, Teiger E, et al. Cardiac modulations of ANG II receptor expression in rats with hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(2):H733-40.
87. Guimaraes GG, Santos SH, Oliveira ML, Pimenta-Velloso EP, Motta DF, Martins AS, et al. Exercise induces renin-angiotensin system unbalance and high collagen expression in the heart of Mas-deficient mice. *Peptides.* 38. United States: 2012 Elsevier Inc; 2012. p. 54-61.
88. .
89. Jankowski V, Vanholder R, van der Giet M, Tolle M, Karadogan S, Gobom J, et al. Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27. United States 2007. p. 297-302.
90. Etelvino GM, Peluso AA, Santos RA. New components of the renin-angiotensin system: alamandine and the MAS-related G protein-coupled receptor D. *Curr Hypertens Rep.* 2014;16(6):433.

91. Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, Silva N, Verano-Braga T, Costa-Fraga F, et al. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ Res.* 2013;112(8):1104-11.
92. da Silva AR, Fraga-Silva RA, Stergiopoulos N, Montecucco F, Mach F. Update on the role of angiotensin in the pathophysiology of coronary atherothrombosis. *Eur J Clin Invest.* 2015.