

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia – UFRGS

Tese de Doutorado

EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO SOBRE O REMODELAMENTO
PULMONAR E CARDÍACO NO MODELO EXPERIMENTAL DE *COR*
PULMONALE INDUZIDO POR MONOCROTALINA

Rafael Colombo

Orientadora: Profa. Dra. Adriane Belló-Klein

Julho de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia – UFRGS

Tese de Doutorado

EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO SOBRE O REMODELAMENTO
PULMONAR E CARDÍACO NO MODELO EXPERIMENTAL DE *COR*
PULMONALE INDUZIDO POR MONOCROTALINA

Tese de doutorado apresentada ao PPG em
Fisiologia como pré-requisito obrigatório para a
obtenção do título de Doutro em Ciências
Biológicas: Fisiologia

Rafael Colombo

Orientadora: Profa. Dra. Adriane Belló-Klein

Julho de 2015

*“A mente que se abre a uma
nova ideia jamais voltará ao
tamanho original.*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Ninguém consegue realizar um trabalho sozinho. Trabalhar em equipe não significa que todos tenham que fazer tudo, mas sim ter a consciência do todo e do papel de cada um no trabalho. Ao terminar essa fase importante da minha vida profissional, olho para trás e vejo que cheguei aqui acompanhado de muitas pessoas. Não acompanhado por todas, mas acompanhado por aquelas que realmente fazem a diferença. Agradeço as minhas duas orientadoras, Maristela Padilha de Souza Rabbo e Adriane Belló Klein, sem as várias oportunidades que recebi delas, com certeza minha vida teria tomado um rumo diferente. Aos colegas de trabalho, que com certeza deixaram a sua marca nesse trabalho e em minha vida. Em especial, aos colegas de laboratório Adriana Conzatti, Alexsandra Zimmer, Amanda de Ávila Bicca Martins, Alex Sander da Rosa Araújo, Bruna Gazzi de Lima Seolin e Paulo Roberto Santos.

Um ciclo que se encerra e outro que se inicia. Gostaria de agradecer às pessoas que abriram os braços a mim, que teriam motivos para desconfiança, mas que ao invés disso me abraçaram em um momento crítico da minha vida profissional. Aos monitores em fisiologia da Universidade de Caxias do Sul, à Simone Maria Andriolo Gross e à Adriane Ribeiro Rosa. Vocês foram indispensáveis para que a vida seguisse o seu rumo, com momentos de críticas e reflexão, mas sobretudo, empatia e vontade de vencer, juntos.

Aos parceiros técnicos deste doutorado, Alessandra Eifler Guerra Godoy, Isnard Lietvin, Jairo Montemor Augusto Silva e Paulo José Ferreira

Tucci. O apoio técnico e a parceria nos possibilitaram a busca constante para as respostas dos problemas criados no início deste trabalho.

Aos melhores amigos, que a vida me ensinou a amar e a cuidar. Tenho dúvidas do quanto eu tenho cuidado dessa amizade nos últimos anos, também sei que vocês tem dúvidas sobre o quanto esse trabalho recebe a força das mãos de vocês. Mesmo assim, posso afirmar, vocês estão sempre ao meu lado, pois a distância física é sempre maior que a nossa conexão espiritual. Rafael Gotuzzo Dill, Maurício Colombo, Jonas Trento Buzzatti, Gustavo Grubel Fernandes, Rodrigo Gomes Luz, Rodrigo Cimirro e Tânia Regina Gattelli Fernandes, muito obrigado por apenas existir.

Um agradecimento especial à minha namorada e colega, colega e namorada, Rafaela Siqueira. Falar qualquer coisa sobre a tua ajuda no campo profissional e pessoal nesses últimos seis anos seria extremamente injusto, dada a necessidade de grande volume de papel para expor toda essa nossa história. Decifrou os meus segredos e se empenhou em melhorá-los. Se hoje me sinto uma pessoa mais preparada para o que há de vir, com tua dedicação, tu criastes várias marcas em mim. Marcas infundáveis. Amo-te.

E por último, uma homenagem ao verdadeiro amor, à família. Meus pais, Lourdes Camargo Colombo e Paulo Luiz Colombo, meu irmão Bruno Colombo, meu querido, amado afilhado, Kalliel Forte Colombo, Taj e Mamão. Amor de família nunca morre, só muda de atmosfera. Um amor mais forte que tudo, mais obstinado que qualquer um, sempiterno. Meu combustível diário para continuar agindo de acordo com as minhas convicções, para agir com justiça, sem me importar com as consequências. As pessoas que me ensinaram a

ouvir antes de falar, a agir ao invés de contar, a respeitar ao invés de cobrar. Amo vocês demais, por ser uma família presente, por ouvir, por criticar, por orientar, por esperar, por apoiar, por amar. Vocês me ensinaram a fazer o certo, mesmo quando ninguém está olhando. Vocês são os verdadeiros líderes. Amo vocês.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS	16
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Patogênese da hipertensão pulmonar	20
1.2 Angiogênese na hipertensão arterial pulmonar	22
1.3 Remodelamento ventricular direito na hipertensão arterial pulmonar	29
1.4 Modelo experimental de hipertensão arterial pulmonar.....	34
2. HIPÓTESES.....	37
2.1 Hipótese 1 (H1)	37
2.2 Hipótese 2 (H2)	37
3. OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
3.2.1 Objetivos específicos – experimento I	37
3.2.2 Objetivos específicos – experimento II	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 Aspectos éticos	39
4.2 Desenho Experimental - Experimento I	40
4.2.1 Avaliação ecocardiográfica.....	42
4.2.2 Análise morfométrica.....	43
4.2.3 Concentração de peróxido de hidrogênio no parênquima pulmonar.....	44
4.2.4 Peroxidação lipídica – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico	44
4.2.5 Atividade das enzimas antioxidantes	45
4.2.6 Análise por Western Blot	45
4.2.7 Avaliação histológica.....	46
4.2.8 Análise imunohistoquímica.....	47
4.2.9 Análise estatística	49
4.3 Desenho Experimental - Experimento II	49
4.3.1 Avaliação ecocardiográfica.....	50

4.3.2 Avaliação hemodinâmica.....	50
4.3.3 Análise morfométrica.....	51
4.3.4 Concentração de peróxido de hidrogênio no ventrículo direito	51
4.3.6 Análise Estatística	52
5. RESULTADOS.....	52
5.1 Resultados artigo I	52
5.3 Resultados artigo II	91
6. DISCUSSÃO CONCLUSIVA.....	123
6.1 O exercício aeróbio estimula o sinal angiogênico dependente do H ₂ O ₂ /VEGF..	123
6.2 O exercício aeróbio melhora a função ventricular direita	129
6.3 Efeitos do exercício aeróbio sobre o remodelamento do ventrículo direito	131
6.4 Imunoconteúdo de proteínas apoptóticas no ventrículo direito	132
6.5 Influência do exercício aeróbio sobre proteínas de sinalização no ventrículo direito.....	133
7. LISTA DE REFERÊNCIAS.....	137
8. ANEXOS	144
8.1 Aceite do artigo 2 e artigo completo: “Aerobic exercise promotes a decrease in right ventricle apoptotic protein in experimental Cor pulmonale” no Journal of Cardiovascular Pharmacology	144

RESUMO

O modelo experimental de Cor pulmonale é caracterizado por um processo de remodelamento vascular pulmonar devido a um insulto inflamatório inicial. O remodelamento vascular é influenciado por apoptose de células endoteliais, hipertrofia da túnica média de arteríolas e pequenas artérias, rarefação vascular e estresse oxidativo. Ao mesmo tempo em que nota-se um remodelamento vascular adverso é importante salientar que o ventrículo direito desempenha um trabalho contra a vasculatura pulmonar, com o objetivo de manter a oxigenação sanguínea. Devido ao aumento de pós-carga imposto ao ventrículo direito, essa câmara hipertrofia, na tentativa de manter um débito cardíaco adequado. Entretanto, o exercício físico estimula a angiogênese, atenua o estresse oxidativo e a apoptose celular e melhora a função cardíaca. Assim, o principal objetivo desta tese foi avaliar o impacto de um programa de exercício físico aeróbio sobre as concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um importante mediador intracelular, e a influência do estresse oxidativo sobre o sinal para a angiogênese pulmonar. Além disso, se essas alterações podem diminuir a sinalização apoptótica, e assim, exercer alguma influência positiva sobre a estrutura e função do ventrículo direito.

Para isso, dividimos os nossos resultados em dois estudos. O experimento I apresenta os resultados obtidos no parênquima pulmonar e a avaliação funcional do ventrículo direito através da ecocardiografia, e o experimento II os resultados obtidos no tecido ventricular direito. O experimento I mostrou que o exercício físico aeróbio promoveu um aumento em proteínas envolvidas com a angiogênese dependentes de H_2O_2 /VEGF/Akt, no

parênquima pulmonar de ratos com *Cor pulmonale*. Ao mesmo tempo, o fortalecimento da resposta angiogênica no grupo treinado e com *Cor pulmonale* esteve associado a benefícios na função do ventrículo direita (tais como a mudança de área fracional, fração de encurtamento e excursão sistólica do plano do anel da tricúspide), avaliados pela ecocardiografia transtorácica. Concomitantemente, o sinal para a angiogênese dependente do H₂O₂ nos indica uma angiogênese fisiológica, caracterizada por uma resposta antioxidante enzimática preservada (avaliada pela a atividade da glutathione peroxidase e da catalase) e por um aumento de Ang-1 (medida por imunohistoquímica). No experimento II, avaliou-se a influência do exercício físico aeróbio sobre proteínas apoptóticas mitocondriais dependentes do H₂O₂ e sua influência sobre a estrutura e função do ventrículo direito. Notou-se que o exercício físico aeróbio atenuou o sinal apoptótico mitocondrial (relação Bax/Bcl-2) e diminuiu o imunoconteúdo da caspase-3. Simultaneamente, observou-se um aumento do imunoconteúdo da proteína p-Akt, envolvida com a sobrevivência celular e inibição do sinal apoptótico mitocondrial. Ademais, essa melhora no perfil molecular, em termos de apoptose mitocondrial, esteve associado a uma atenuação da resistência vascular pulmonar, avaliada através da ecocardiografia transtorácica.

Em síntese, o exercício físico aeróbio aumentou o imunoconteúdo de proteínas envolvidas com a angiogênese pulmonar e diminuiu o sinal apoptótico mitocondrial no ventrículo direito. Essas respostas parecem estar associadas a uma melhora, promovida pelo exercício aeróbio, na função do ventrículo direito de ratos com *Cor pulmonale*, um dos principais fatores envolvidos com os altos índices mortalidade e morbidade da hipertensão arterial pulmonar.

ABSTRACT

Experimental model of *Cor pulmonale* is characterized by pulmonary vascular remodeling due to an initial inflammatory insult. Vascular remodeling is affected by endothelial cell apoptosis, hypertrophy of the tunica media of small arteries and arterioles, oxidative stress and vascular rarefaction. At the same time that is noted an adverse vascular remodeling, it is important to know that the right ventricle performs work against pulmonary vasculature in order to maintain blood oxygenation. Due to increased afterload imposed to the right ventricle, this chamber hypertrophy, to try to maintain an adequate cardiac output. However, exercise stimulates angiogenesis, attenuate oxidative stress and apoptosis, and improves cardiac function. Therefore, the main objective of this thesis was to evaluate the impact of aerobic exercise on the H₂O₂ concentrations, an important intracellular mediator, and the influence of oxidative stress on lung signal for angiogenesis. Also, if these changes can decrease the apoptotic signaling, and thus, exert some positive influence on the structure and function of the right ventricle.

For this purpose, we divided our results in two experiments. The experiment I showed the results obtained in the lung parenchyma and the functional assessment of the right ventricle by echocardiography; and the experiment II the results obtained in right ventricular tissue. The experiment I showed that aerobic exercise promoted an increase in H₂O₂/VEGF/Akt dependent angiogenic signaling in the lung parenchyma of rats with *Cor pulmonale*. At the same time, the strengthening of the angiogenic response in the TM group was associated with benefits in the function of the right ventricle (such as fractional area change, fractional shortening and tricuspid annular

plane systolic excursion), assessed by transthoracic echocardiography. The H₂O₂ dependent angiogenic signal indicates a physiological angiogenesis, characterized by a maintained enzymatic antioxidant response (as measured by the activity of catalase and glutathione peroxidase) and increased Ang-1 (measured by immunohistochemistry). In the experiment II, it was evaluated the influence of aerobic exercise on H₂O₂ dependent mitochondrial apoptotic proteins and its influence on the structure and function of the right ventricle. It was noted that aerobic exercise attenuated mitochondrial apoptotic signal (through Bax/Bcl-2 ratio) and decreased immunocontent of caspase-3. Simultaneously, there was observed an increase in immunocontent of p-Akt, a protein involved in cell survival and inhibition of mitochondrial apoptotic signal. Moreover, this improvement in the molecular profile in terms of mitochondrial apoptosis, was associated with a pulmonary vascular resistance attenuation, assessed by transthoracic echocardiography.

In short, aerobic exercise increased the immunocontent of proteins involved with physiological pulmonary angiogenesis and decreased mitochondrial apoptotic signal in the right ventricle. These responses appear to be associated with an improvement, promoted by aerobic exercise, in right ventricle function of rats with *Cor pulmonale*, one of the main factors involved with high rates mortality and morbidity of pulmonary arterial hypertension.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – *Lei de Laplace*

Figura 2A. *Crotalaria spectabilis*. B. Estrutura química do alcaloide pirrolizidínico Monocrotalina

Artigo I

Figura 1A. Hydrogen peroxide concentrations in the lung parenchyma

Figura 1B. Thiobarbituric acid reactive substances in lung parenchyma

Figura 2A. Superoxide dismutase activity in lung parenchyma

Figura 2B. Superoxide dismutase immunocontent in lung parenchyma

Figura 2C. Catalase activity in lung parenchyma.

Figura 2D. Catalase immunocontent in lung parenchyma

Figura 2E. GPx activity in lung parenchyma

Figura 2F. Prx immunocontent in lung parenchyma

Figura 3A. VEGF immunocontent in lung parenchyma

Figura 3B. Localization of VEGF in rat lung sections by immunohistochemical staining

Figura 3C. Localization of Ang-1 in rat lung sections by immunohistochemical staining

Figura 3D. Localization of Tie-2 in rat lung sections by immunohistochemical staining

Figura 3E. PI3K immunocontent in lung parenchyma

Figura 3F. PTEN immunocontent in lung parenchyma

Figura 3G. p-Akt immunocontent in lung parenchyma

Figura 3H. p-Akt immunocontent in lung parenchyma

Figura 4A. Representative images of macrophages presence in lung parenchyma

Figura 4B. Representative images of inflammatory infiltrate in lung parenchyma

Figura 5A. Correlation between H₂O₂ and VEGF immunocontent.

Figura 5B. Correlation between p-Akt and VEGF immunocontent.

Figura 6. Acceleration time of pulmonary artery flow/ejection time of pulmonary artery flow (AT/ET)

Figura 6B. Fractional area change (FAC)

Figura 6C. Tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE)

Tabela 1. Morphometric and ecocardiographic parameters of the right ventricle

Artigo II

Figura 1. Acceleration time/Ejection time (AT/ET ratio)

Figura 2. Pulmonary artery pressure (PAP) in mmHg

Figura 3. Right ventricle hydrogen peroxide levels

Figura 4. p-Akt immunocontent

Figura 5. Bax/Bcl-2 immunocontent

Figura 6. Signalling proteins involved in the influence of exercise on *Cor pulmonale* resulting from pulmonary hypertension induced by monocrotaline

Tabela 1. Morphometric parameters of the different experimental groups measured at the end of the experimental protocol

Tabela 2. Proteins involved in exercise-induced hypertrophy and apoptotic signalling

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	serotonina
Akt	proteína quinase B
Ang-1	angiopoietina 1
Ang-2	angiopoietina 2
AT/ET	razão entre o tempo de aceleração e o tempo de ejeção
ATPS	3-aminopropyltriethoxysilene
Bax	proteína X associada à Bcl-2
Bcl-2	célula- β de linfoma 2
BMPR2	receptor da proteína óssea morfogenética 2
CAT	catalase
CO	débito cardíaco
DO	densidade óptica
E/A	razão entre a velocidade máxima do enchimento rápido pelo enchimento lento
ECs	células endoteliais
ERO	espécies reativas de oxigênio
ET-1	endotelina 1
FAC	mudança de área fracional

FEC	fração de encurtamento
GPx	glutathiona peroxidase
GSK3 β	quinase da glicogênio sintase 3 beta
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HAP	hipertensão arterial pulmonar
HE	hematoxilina-eosina
HP	hipertensão pulmonar
ICD	insuficiência cardíaca direita
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1	interleucina 1
IL-6	interleucina 6
MCT	monocrotalina
MPI	índice de performance miocárdico
mTORC2	proteína alvo da rapamicina em mamíferos 2
NaCl	cloreto de sódio
NADPH	adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NaOH	hidróxido de sódio
NO	óxido nítrico
Nox4	adenina dinucleotídeo fosfato reduzido oxidase 4

O ₂ ⁻	ânion superóxido
OH·	Radical hidroxil
PAH	<i>pulmonar arterial hypertension</i>
PAP	<i>pulmonar artery pressure</i>
PDK-1	quinase -1 dependente do fosfoinosítídeo
PI3K	fosfoinosítídeo 3-quinase
PIP2	fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PIP3	fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato
PKA	quinase dependente de AMPc
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoreto
PRS	solução de vermelho de fenol
Prx	peroxirredoxina
PSVD	pressão sistólica do ventrículo direito
PTEN	fosfatase homóloga à tensina
PVDF	polivinilideno difluoreto
PVR	pulmonar vascular resistance
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RVH	<i>right ventricular hypertrophy</i>
RVP	resistência vascular pulmonar

SC	controle sedentário
SDS-PAGE	dodecil sulfato de sódio-eletroforese com gel de poliacrilamida
SM	monocrotalina sedentário
SOD	superóxido dismutase
SV	volume sistólico
TAPSE	excursão sistólica do plano do anel da tricúspide
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TC	controle treinado
TGF- β	fator de crescimento tumoral beta
TM	monocrotalina treinado
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
VD	ventrículo direito
VEGF	fator de crescimento do endotélio vascular

1. INTRODUÇÃO

1.1 Patogênese da hipertensão pulmonar

A hipertensão pulmonar (HP) é uma doença progressiva e incapacitante que é caracterizada por vasoconstrição, remodelamento de pequenas artérias e arteríolas pulmonares, formação de lesões plexiformes e trombose, e rarefação vascular (RUNO; LOYD, 2003). Clinicamente, a HP pode ser diagnosticada através de cateterismo de ventrículo direito, presença de pressão pré-capilar maior que 25 mmHg e pressão de oclusão da artéria pulmonar menor que 15 mmHg (MONTANI et al., 2013). De acordo com a classificação clínica atual, preconizada em 2013, em Nice, a HP pode ser classificada em cinco grupos, de acordo com os achados patológicos, características hemodinâmicas e formas de tratamento (SIMONNEAU et al., 2013). O grupo 1 (Hipertensão Arterial Pulmonar – HAP) contempla uma forma da doença que pode ter origens variadas. Dentre as características mais comuns a esse grupo, podemos citar a etiologia diversificada e multifatorial, a mutação no gene que expressa o receptor da proteína óssea morfogenética II (BMP2), um membro da família do fator de crescimento tumoral beta (TGF- β), o aumento no estresse oxidativo e a inflamação vascular (SIMONNEAU et al., 2013).

A sobrevida dos pacientes afetados pela HAP gira em torno de 55% a 65% em 3 anos (VAILLANCOURT et al., 2014). Além de ser uma doença com alta mortalidade, a HAP é altamente incapacitante e sem cura. Durante os últimos 20 anos, muitos estudos pré-clínicos com o objetivo de melhorar a sobrevida e promover alterações benéficas na HAP foram realizados,

entretanto, poucos realmente contribuíram de uma forma translacional efetiva com a conduta clínica para o manejo dessa doença (GURTU; MICHELAKIS, 2015). Historicamente, a comunidade científica preocupada com o tratamento da HAP, tem se voltado fortemente ao uso clínico de vasodilatadores, tais como; os antagonistas para os receptores de endotelina, inibidores da fosfodiesterase tipo 5 e análogos das prostaciclina. No entanto, a HAP é uma doença caracterizada também por remodelamento vascular proliferativo, e não somente por vasoconstrição. Portanto, as terapias utilizadas atualmente promovem apenas uma melhora na qualidade de vida e limitam os sintomas da HAP, não demonstrando efeitos sobre o tempo de sobrevivência e sobre a reversibilidade dessa doença (GURTU; MICHELAKIS, 2015).

Como citado anteriormente, a HAP é uma doença caracterizada por um processo inflamatório crônico e estresse oxidativo. Essa resposta é desencadeada por duas fases: um sinal inflamatório inicial, seguido por uma resposta fenotípica pulmonar (LIAO, 2013). A resposta inicial é rápida, gerada por uma menor biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), aumento na produção de endotelina 1 (ET-1), serotonina (5-HT) e tromboxano. Essas alterações estimulam a sinalização para a apoptose das células endoteliais (CEs), o que acaba por expor a camada subendotelial a fatores de crescimento e citocinas inflamatórias liberadas pelas CEs. Além da exposição da camada subendotelial aos fatores de crescimento, as células endoteliais comunicam-se com as células musculares lisas através da lâmina basal interna. Dessa forma, na HAP, nota-se a difusão de ET-1, 5-HT e mediadores inflamatórios (fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6)) em direção à túnica média (VAILLANCOURT et al., 2014). A liberação de mediadores inflamatórios e

fatores de crescimento promovem um aumento da espessura da camada muscular lisa (túnica média), e remodelamento da membrana basal (túnica adventícia) (NEWBY, 2006).

O exercício físico normalmente é considerado um adjuvante no tratamento das doenças cardiovasculares. No entanto, a sua utilização como uma terapia para pacientes com HAP não é um consenso na prática clínica (ARENA et al., 2014). Devido às significativas consequências patológicas associadas à HAP, e suas implicações na piora da função ventricular direita, o exercício físico é contraindicado até para aqueles pacientes mais levemente afetados pela doença (ARENA et al., 2014). Pacientes com HAP apresentam um aumento da resistência periférica total e uma diminuição do débito cardíaco em repouso e durante o exercício físico. Esses fatos somados acabam por diminuir a oferta de oxigênio tecidual e aumentam o trabalho cardíaco durante o exercício (ARENA et al., 2014; WAXMAN, 2012). Entretanto, alguns estudos atuais demonstram claramente que o exercício físico pode ser considerado uma terapia adjuvante promissora e eficaz, agindo diretamente sobre modificações nos padrões estruturais e funcionais dos pulmões e coração na HAP (BUYS; AVILA; CORNELISSEN, 2015). Devido a essa controvérsia, este estudo abordará alguns dos mecanismos pelos quais o exercício aeróbio pode influenciar o remodelamento estrutural e funcional dos pulmões e coração.

1.2 Angiogênese na hipertensão arterial pulmonar

O remodelamento vascular é um processo complexo que varia de acordo com o tempo e com a variação dos estímulos bioquímicos, moleculares e físicos (YU et al., 2009). Entretanto, os mecanismos envolvidos com a

angiogênese pulmonar na HAP ainda não estão completamente elucidados. Os sinais moleculares que estão envolvidos com a angiogênese são dependentes do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e das angiopoietinas. A angiogênese pode ser dividida em angiogênese fisiológica ou patológica, dependendo das características apresentadas pelo quadro angiogênico. A angiogênese fisiológica é iniciada por estímulos celulares que são desencadeados pela hipóxia e pelo estresse de parede, causando um aumento na expressão do VEGF e uma modificação no balanço proteolítico celular. Essa modificação metabólica leva a uma desestabilização das CEs quiescentes, conhecidas como *Tipp Cells*, perda da interação entre as células musculares e pericitos, e extravasamento plasmático. As proteínas plasmáticas formam uma nova matriz extracelular, que serve como base para a migração das CEs desestabilizadas. Após a migração das *Tipp Cells*, as CEs vizinhas se proliferam, dando forma ao novo vaso. A estabilização do novo vaso é alcançada através da proliferação e migração das células musculares, pericitos e formação da nova membrana basal (CLAESSON-WELSH; WELSH, 2013; COCHAIN; CHANNON; SILVESTRE, 2012; YU et al., 2009).

Os mecanismos moleculares envolvidos com a angiogênese fisiológica é iniciado pela ligação do VEGF ao seu receptor tirosina cinase, levando a um aumento da expressão da angiopoietina 1 (Ang-1), que se liga ao seu receptor (Tie-2) e estimula a expressão de proteínas de sinalização intracelular envolvidas com a sobrevivência e síntese de NO. Essa via de sinalização envolvida com a angiogênese fisiológica parece ser mediada pelo via da fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K)/proteína cinase B (Akt) (FAGIANI; CHRISTOFORI, 2013). Além de estimular a migração das ECs, o VEGF tem

papel importante na maturação do vaso. Através da fosforilação da Akt e do aumento da expressão da Ang-1, nota-se uma melhora na estrutura e estabilização vascular. Camundongos *knockout* para a Ang-1 apresentaram dilatação vascular, diminuição na complexidade da rede de vasos e proliferação exagerada de ECs e de pericitos, prejudicando a função do vaso (THURSTON et al., 1999). Assim, tanto o sinal desencadeado pelo VEGF, quanto o aumento da expressão da Ang-1, são importantes para a angiogênese fisiológica.

A angiogênese patológica compartilha muitas das características bioquímicas e moleculares da angiogênese fisiológica, mas ela é caracterizada por uma falha na fase de finalização do vaso e pela presença de uma rede vascular altamente desorganizada estrutural e funcionalmente (IMHOF; AURRAND-LIONS, 2006). Em situações onde ocorre um aumento na produção de citocinas inflamatórias, o TNF- α estimula a produção de angiopoietina 2 (Ang-2). A Ang-2 é um peptídeo que atua sobre o mesmo receptor da Ang-1, o Tie-2, entretanto, sua função é inversa. A Ang-2 atua inibindo a ligação da Ang-1 ao receptor Tie-2, minimizando o seu efeito anti-inflamatório, promovendo um aumento da sensibilidade das ECs ao TNF- α , e diminuindo a estabilidade e maturação vascular. Ao mesmo tempo em que a Ang-2 promove um aumento na sensibilidade das ECs ao VEGF, a angiogênese vascular adquire uma característica patológica por apresentar um quadro de inflamação crônica (COCHAIN; CHANNON; SILVESTRE, 2012; FAGIANI; CHRISTOFORI, 2013; IMHOF; AURRAND-LIONS, 2006).

Dentre os vários mediadores para o sinal angiogênico, as espécies reativas de oxigênio (ERO) demonstram grande importância. As ERO são uma

classe de moléculas derivadas do metabolismo oxidativo, dentre elas podemos destacar o radical livre ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil (OH^{\cdot}), e as espécies não-radicais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Todas essas moléculas apresentam alguma instabilidade e exercem importante papel na oxidação de biomoléculas. Essa oxidação pode promover dano a lipídios de membrana celular e a proteínas intracelulares. Durante anos, numerosos estudos demonstraram um envolvimento das ERO na patogênese de diversas doenças, dentre elas, a aterosclerose, hipertensão arterial sistêmica, infarto agudo do miocárdio e HAP. Estudos mais recentes demonstram que, além de atuarem promovendo dano celular direto, as variações nas concentrações das ERO podem promover modificações pós-traducionais em proteínas intracelulares, e assim mediar a sinalização para muitos eventos celulares importantes (FORMAN; MAIORINO; URSINI, 2010; TAKANO et al., 2003).

A sinalização intracelular mediada pelas ERO é conhecida como sinalização redox. A sinalização redox refere-se normalmente a um processo de oxirredução, envolvendo resíduos de cisteína e metionina das proteínas intracelulares. Dentre todos os radicais livres e ERO, o H_2O_2 é a que apresenta a maior importância na sinalização redox. Essa influência do H_2O_2 deve-se à sua maior estabilidade e maior tempo de meia-vida, e também ao maior poder de difusão através das membranas celulares. Assim, essa espécie consegue promover a oxidação de grupamentos tiois (-SH), através da transição de um, dois, quatro ou seis elétrons para os resíduos de cisteína das proteínas intracelulares (BURGOYNE et al., 2012; FORMAN; MAIORINO; URSINI, 2010). Dentre os eventos celulares que podem sofrer modulação pelo H_2O_2 , encontra-se a via de sinalização da PI3K/Akt e a angiogênese (ZHOU et al., 2013).

Ao retomar as informações acerca da influência das ERO sobre a angiogênese, é importante destacar que essas espécies podem atuar facilitando o sinal angiogênico dependente do VEGF e das angiopoietinas (KIM et al., 2006). A produção de ERO durante a angiogênese está envolvida com a fosforilação das caderinas, glicoproteínas envolvidas com a adesão das ECs. Essa fosforilação promove uma desestabilização das ECs, facilitando a sua migração e formação de um novo vaso (MONAGHAN-BENSON; BURRIDGE, 2009). Além disso, as ERO e, principalmente, o H_2O_2 , quando em concentrações baixas, promovem a oxidação reversível de proteínas fosfatases, inibindo a atividade dessas proteínas que estão envolvidas com a inibição do sinal dependente do VEGF (ZHOU et al., 2013).

As ERO também podem agir negativamente sobre a angiogênese. Quando produzidas cronicamente e em altas concentrações, elas atuam de forma negativa, deteriorando a estrutura vascular. Já quando as concentrações de ERO são intermitentes, ou quando em baixas concentrações, as ERO exercem papel fundamental para a angiogênese e estabilização desse novo vaso (YUN et al., 2009). Alguns estudos que utilizaram o H_2O_2 para induzir a angiogênese mostraram que, quando em altas concentrações ($>125 \mu M$), o peróxido causou injúria endotelial; já em baixas concentrações (0,1 a $10 \mu M$), o peróxido estimulou a formação da membrana basal e a maturação normal do vaso (YASUDA et al., 1999). A angiogênese patológica é caracterizada por inflamação, hiperplasia e hipertrofia da túnica média vascular, gerando a obliteração de arteríolas e vasos menores (YU et al., 2009). A angiogênese patológica pode ser influenciada pelas ERO, e está normalmente ligada a situações patológicas, onde a liberação de citocinas inflamatórias pelos

macrófagos aumenta. As citocinas atuam atraindo monócitos para o local da lesão, podendo se diferenciar em macrófagos e aumentar ainda mais a produção de ERO. Dessa forma, o aumento pronunciado de macrófagos e de ERO no sítio da inflamação aumenta a produção de VEGF, mas também de Ang-2, um peptídeo pró-inflamatório e envolvido com a desestabilização e má formação vascular. (KIM; BYZOVA, 2014)

A angiogênese fisiológica é um dos processos que pode estar relacionado a uma redução da resistência vascular ao fluxo de sangue (YU et al., 2009). Entretanto, na HAP nota-se uma redução na quantidade e na qualidade vascular, podendo provocar um aumento da pós-carga imposta ao ventrículo direito. Muitas células imunes estão aumentadas na HAP. Nota-se a presença maciça de macrófagos nas lesões plexiformes e no infiltrado inflamatório pulmonar de pacientes com HAP (SAVAI et al., 2012). Em um estudo recente, foi demonstrada uma correlação forte entre a inflamação vascular e o aumento na liberação de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-1 e TNF- α) e a piora no desfecho da doença (SATO et al., 2014). Assim, fica claro que, apesar de notarmos um forte estímulo para a angiogênese em situações de alta produção de ERO e de sinal inflamatório intenso, o aumento na expressão da Ang-2, a sinalização para a apoptose das ECs e a proliferação das células musculares lisas nessas situações, estimula a má formação vascular na HAP. Isso demonstra que a angiogênese fisiológica pode exercer um impacto positivo para a manutenção de um fluxo sanguíneo adequado para os pulmões.

O exercício físico atua como um potente sinal angiogênico. Ademais, o exercício promove um aumento do número de vasos mantendo a sua estrutura e função (LEOSCO et al., 2008). Uma única sessão de exercício progressivo foi

capaz de aumentar a expressão do VEGF, logo após o término da sessão (VAN CRAENENBROECK et al., 2010). Em estudo publicado em 2008, visualizou-se um aumento na expressão do VEGF, da Akt e da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), após a prática de exercício aeróbio. Esse aumento na expressão de proteínas envolvidas com a angiogênese estimulou a formação e maturação de pequenas arteríolas e capilares (LEOSCO et al., 2008). Além disso, o exercício físico aeróbio crônico reduz os níveis circulantes de monócitos, a expressão de genes inflamatórios, tais como; TNF- α e IL-6 e também reduz o recrutamento de um número ainda maior de macrófagos ao local da inflamação (KAWANISHI et al., 2010). Apesar de não termos nenhuma informação na literatura acerca da influência do exercício físico aeróbio sobre a angiogênese pulmonar na HAP, levando em consideração os dados já publicados na área da formação de novos vasos, o exercício físico surge como uma possível ferramenta envolvida com o estímulo para a angiogênese fisiológica nessa doença.

O remodelamento vascular na HAP é caracterizado por uma inflamação vascular, vasoconstrição, aumento pronunciado na produção de ERO e menor angiogênese. Todos esses sinais promovem uma obliteração vascular, aumento da resistência vascular pulmonar e aumento da pós-carga imposta ao ventrículo direito. Em resposta ao aumento da pós-carga, o ventrículo direito (VD) hipertrofia e aumenta a contratilidade, na tentativa de manter o estresse de parede. Dessa forma, atuar sobre a angiogênese pulmonar pode exercer um impacto positivo sobre a estrutura e função de VD.

1.3 Remodelamento ventricular direito na hipertensão arterial pulmonar

As principais manifestações clínicas da insuficiência cardíaca direita (ICD) geralmente são a menor tolerância ao exercício físico e edema. A menor tolerância ao exercício físico é um sinal precoce, sendo considerado um importante preditor de sobrevida na HAP (BENZA et al., 2010). Nesses pacientes, a causa mais comum de morte é a ICD, ou seja, um remodelamento ventricular direito, ocasionado por uma alteração na estrutura e/ou função pulmonar, doença também conhecida como *Cor pulmonale* (HOEPER et al., 2002). O *Cor pulmonale* pode ser subdividido da mesma forma que na insuficiência cardíaca esquerda: risco para a insuficiência cardíaca (A); disfunção cardíaca assintomática (B); insuficiência cardíaca sintomática (C) e insuficiência cardíaca em estágio final (D). É importante salientar que mesmo os pacientes que se encontram no grupo D podem apresentar uma reversão da hipertrofia ventricular direita após o transplante pulmonar (HOEPER et al., 2002).

A parede do VD é mais delgada que a do ventrículo esquerdo, o que reflete uma resposta à menor pressão do sistema arterial pulmonar em comparação com a circulação sistêmica, permitindo rápida adaptação frente a alterações na pré-carga. Com o aumento na pós-carga imposta ao VD, para manter uma função sistólica adequada, nota-se um aumento no trabalho cardíaco, seguido por um aumento na espessura da parede e diminuição do raio interno da cavidade. As alterações estruturais e funcionais visualizadas no VD têm como objetivo manter o estresse de parede e um débito cardíaco adequado (Figura 1) (BOGAARD et al., 2009).

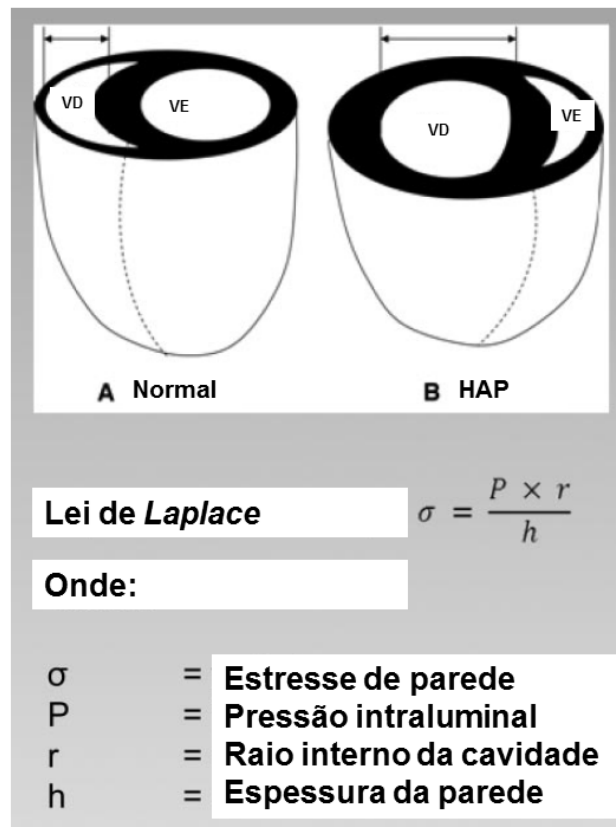


Figura 1. Configuração do VD numa situação normal e na hipertensão arterial pulmonar de acordo com a Lei de *Laplace* (BOGAARD et al., 2009).

Na maioria dos pacientes com HAP, esses mecanismos compensatórios são insuficientes, e assim a ICD se instala (VONK-NOORDEGRAAF et al., 2013). O remodelamento ventricular em decorrência da HAP pode apresentar diferentes características estruturais e funcionais, dependendo dos estímulos, e também do momento em que é realizada a análise durante a progressão da doença. Sendo assim, a hipertrofia pode ser conceituada em adaptativa e mal-adaptativa. A hipertrofia adaptativa é caracterizada por uma hipertrofia concêntrica, função sistólica e diastólica preservada. Já a hipertrofia mal-adaptativa é caracterizada por hipertrofia excêntrica, piora na função sistólica e

diastólica (VONK-NOORDEGRAAF et al., 2013). Muitos mecanismos moleculares estão envolvidos com a transição da hipertrofia adaptativa para a mal-adaptativa na HAP. Devido ao aumento no estresse de parede e o subsequente aumento no consumo de oxigênio, os cardiomiócitos aumentam a produção de ERO, a produção de mediadores inflamatórios e o sinal para a apoptose é fortalecido (BOGAARD et al., 2009).

As ERO estão intimamente ligadas ao declínio funcional e ao remodelamento mal-adaptativo do coração no *Cor pulmonale* (FARAHMAND; HILL; SINGAL, 2004). Em estudos publicados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, o exercício físico aeróbio promoveu uma melhora na sobrevivência de ratos com HAP, fato que se mostrou associado ao aumento na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), diminuição na lipoperoxidação e aumento no volume de vasos intramiocárdicos (COLOMBO et al., 2013; SOUZA-RABBO et al., 2008a). Muitas evidências sugerem que as ERO servem como segundos mensageiros intracelulares, mediando ambas, a hipertrofia adaptativa e mal-adaptativa (RHEE, 1999). É sabido que um aumento pronunciado de ERO pode agir de forma negativa sobre muitas funções celulares, e assim promover alterações estruturais e funcionais que levam à hipertrofia mal-adaptativa e insuficiência cardíaca. Um dos eventos diretamente ligados à insuficiência cardíaca é a ativação de proteínas intracelulares envolvidas com a apoptose. Apoptose é um termo utilizado para definir a morte celular programada, que pode ocorrer devido à hipóxia, isquemia tecidual ou a ligação de agentes extracelulares que podem induzir a morte celular (FLUSBERG; SORGER, 2015). As modificações no metabolismo celular podem agir sobre a apoptose através da modulação da função mitocondrial.

A mitocôndria pode participar da sinalização redox sensível, pois se trata da principal organela envolvida com a formação de H_2O_2 . Como já discutido anteriormente, devido a sua alta capacidade de difusão através das membranas e maior tempo de meia-vida, o peróxido medeia respostas intracelulares importantes, dentre elas a apoptose. Em situações de estresse oxidativo, a oxidação dos grupamentos tióis pode se tornar um evento irreversível, modificando a estrutura de proteínas envolvidas com o sinal apoptótico nos cardiomiócitos (SHAO et al., 2012). A via de transdução de sinal dependente da proteína G estimulatória (influenciada pela ET-1, estresse de parede, angiotensina II e estimulação adrenérgica) leva à apoptose dos cardiomiócitos, facilitando a abertura dos poros de transição da membrana mitocondrial através do aumento na expressão da proteína X associada à Bcl-2 (Bax), e estimulando o fenótipo hipertrófico mal-adaptativo (BERNARDO et al., 2010). Além disso, o estresse celular induzido pelo aumento na produção de ERO pode iniciar a ativação de proteínas mitocondriais que irão interagir com a proteína Bax. Essa interação pode promover a abertura de poros mitocondriais, e assim aumentar a liberação de citocromo c. A liberação de citocromo c é crucial para a formação do apoptossomo e para a ativação da caspase-3, uma proteína envolvida diretamente com a apoptose celular (DORN, 2012).

Em um estudo publicado em 2010, utilizando ECs da veia umbilical, notou-se uma diminuição na expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 quando essas células foram tratadas com H_2O_2 . No mesmo estudo, notou-se um aumento na expressão da proteína pró-apoptótica Bax (HU; SUN; HU, 2010). No entanto, o uso de um antioxidante conhecido como catalpol foi capaz de aumentar a atividade de uma proteína envolvida com a sobrevivência celular

e hipertrofia adaptativa induzida pelo exercício (proteína quinase B – Akt), aumentar a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (antagonista da proteína Bax), e inativar a sinalização para a apoptose dependente da Bax (HU; SUN; HU, 2010).

Por outro lado, sabe-se que quando em baixas concentrações, a formação de ERO é fundamental para uma resposta adaptativa celular, que pode promover a citoproteção. Esse conceito onde as ERO, quando em baixas concentrações, estimulam uma resposta celular adaptativa é conhecido como hormese (SAMJOO et al., 2013). O exercício físico aeróbio é um ótimo exemplo de efeito hormético exercido pelas ERO, quando produzidas de forma intermitente e em baixas concentrações. Acredita-se que essa resposta está intimamente relacionada a um aumento na expressão e atividade de proteínas antioxidantes induzidas pelo exercício físico aeróbio (GOUNDER et al., 2012). Além disso, um pequeno e transitório aumento na formação de ERO causado pelo exercício pode iniciar uma resposta adaptativa benéfica, a qual é caracterizada por um efeito positivo sobre o remodelamento e função cardíaca, e ativação da proteína quinase dependente do AMPc (PKA) e da Akt (FRASIER; MOORE; BROWN, 2011).

De acordo com a literatura, há duas vias independentes para a ativação da Akt através do exercício físico. A primeira é a via clássica dependente do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1). A outra via conhecida é através do aumento da expressão e atividade da PKA, enzima que utiliza o AMPc como co-fator (FILIPPA et al., 1999; SONG; OUYANG; BAO, ; YANG et al., 2002). Dessa forma, dependendo da concentração de ERO, e principalmente de H₂O₂, pode-se notar modificações em relação às vias de

sinalização para a sobrevivência celular e apoptose, e assim perceber uma modulação fenotípica adaptativa ou mal-adaptativa no *Cor pulmonale* (BURGOYNE et al., 2012; SHAO et al., 2012).

Há uma lacuna científica em relação aos possíveis efeitos do exercício físico aeróbio sobre a sinalização intracelular redox-sensível e as suas relações com o remodelamento do ventrículo direito no *Cor pulmonale*. Devido à grande controvérsia a respeito dos efeitos do exercício físico no manejo da HAP e do *Cor pulmonale*, a busca por informações que respondam questões centrais sobre a importância deste tratamento adjuvante deve ser intensificada. Assim, para elucidar qual o efeito do exercício físico sobre o remodelamento molecular, bioquímico, estrutural e funcional, faz-se necessário a utilização de modelos experimentais que mimetizem as principais alterações encontradas nessas doenças.

1.4 Modelo experimental de hipertensão arterial pulmonar

Os alcaloides pirrolizidínicos são uma classe grande de fitotoxinas encontradas em mais de 560 plantas distribuídas ao redor do mundo. A monocrotalina (MCT) é encontrada em plantas leguminosas como a *Crotalaria spectabilis* e *Crotalaria retusa* (Figura 2) (REID et al., 1997).

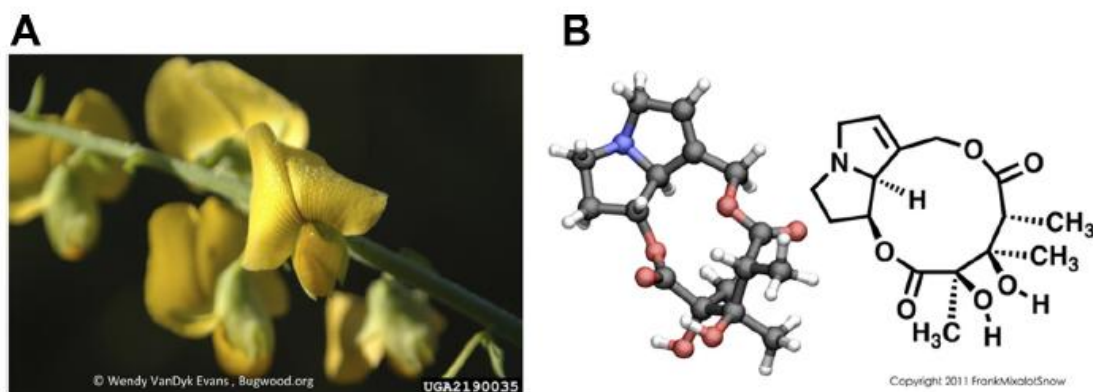


Figura 2A. *Crotalaria spectabilis*. B. Estrutura química do alcaloide pirrolizidínico Monocrotalina (GOMEZ-ARROYO et al., 2012).

A sua toxicidade é observada após a sua ingestão, por animais ou humanos. A MCT age no fígado, promovendo toxicose, caracterizada por necrose periacinar, hepatomegalocitose, fibrose e hiperplasia biliar, levando a doenças veno-oclusivas e hipertensão portal (REID et al., 1997). A sua biotransformação hepática é a responsável pela sua toxicidade, sendo que a dehidroxilação, realizada pelo complexo enzimático da *P*-450 (CYP3A4), é uma das reações químicas envolvidas com esse processo. Após a sua dehidroxilação, o metabólito ativo dehidromonocrotalina, além de atuar no fígado, promove alterações estruturais e funcionais nos pulmões. O seu mecanismo de ação pulmonar ainda não está totalmente elucidado; no entanto, sabe-se que a sua ingestão provoca megalocitose nas ECs, diminuição na produção de NO, e aumento na expressão de proteínas envolvidas com a proliferação e apoptose celular (SEHGAL; MUKHOPADHYAY, 2007).

O início da lesão endotelial gerada pela MCT tem sido associado a alterações na função dos receptores BMPRII, uma diminuição na sua expressão e um aumento na atividade de proteínas intracelulares que agem no sequestro e inibição deste receptor (RAMOS et al., 2007). Apesar de a MCT

promover uma disfunção nas ECs da artéria pulmonar, o principal mecanismo pelo qual essa droga promove alterações na estrutura e função da vasculatura pulmonar é através de uma hipertrofia da túnica média (GOMEZ-ARROYO et al., 2012). Como citado anteriormente, a MCT promove uma resposta inflamatória nas ECs, que conseqüentemente influencia a resposta hipertrófica e hiperplásica das células musculares lisas. O aumento no volume e número das fibras musculares diminui o diâmetro luminal da vasculatura pulmonar, sobrecarregando mecanicamente o VD. Com o intuito de manter o estresse de parede constante, o aumento da pós-carga promove a hipertrofia do ventrículo direito e o *Cor pulmonale* (DUMITRASCU et al., 2008; GOMEZ-ARROYO et al., 2012).

Essas alterações são dependentes do tempo de análise e da dose de MCT administrada. A dose mais utilizada pela comunidade científica é a de 60 mg/kg. Entre 3 e 4 semanas após a injeção intraperitoneal (i.p.) de MCT, nota-se uma hipertrofia da túnica média de pequenas artérias e arteríolas pulmonares, aumento da pressão na artéria pulmonar e hipertrofia ventricular direita (COLOMBO et al., 2013; GOMEZ-ARROYO et al., 2012; SOUZA-RABBO et al., 2008). Sendo assim, o modelo de HAP por injeção de MCT é adequado para avaliar os efeitos do exercício físico sobre a angiogênese pulmonar e a apoptose cardíaca 3 semanas após a administração de MCT.

2. HIPÓTESES

2.1 Hipótese 1 (H1)

O exercício físico aeróbio estimula o sinal angiogênico pulmonar dependente de H₂O₂/VEGF/p-Akt e melhora a função do ventrículo direito em ratos com *Cor pulmonale*.

2.2 Hipótese 2 (H2)

O exercício físico aeróbio diminui a resistência vascular pulmonar e atenua o sinal apoptótico dependente de H₂O₂/Bax/caspase-3 em ratos com *Cor pulmonale*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência do exercício físico aeróbio sobre o remodelamento vascular pulmonar e remodelamento cardíaco no modelo experimental de *Cor pulmonale*.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Objetivos específicos – experimento I

1. Avaliar a influência do exercício aeróbio sobre as concentrações de peróxido de hidrogênio, a atividade e o imunoconteúdo das enzimas

antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) e o dano oxidativo a lipídios de membrana no parênquima pulmonar de ratos com *Cor pulmonale*;

2. Avaliar a influência do exercício aeróbio sobre o imunoconteúdo de proteínas envolvidas com a angiogênese fisiológica (VEGF, PI3K, Akt total, p-Akt e PTEN) em modelo experimental de *Cor pulmonale*;
3. Avaliar a influência do exercício aeróbio sobre o VEGF, Ang-1 e Tie-2 por imunohistoquímica no parênquima pulmonar de ratos com *Cor pulmonale*;
4. Correlacionar o estresse oxidativo (concentração de peróxido de hidrogênio e enzimas antioxidantes) com a sinalização para a angiogênese;
5. Padronizar, no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFRGS, a avaliação da função do ventrículo direito através da ecocardiografia transtorácica;
6. Verificar a influência das modificações induzidas pela monocrotalina e pelo exercício aeróbio sobre a função ventricular direita avaliada através do volume sistólico, débito cardíaco, excursão sistólico do plano do anel da tricúspide (TAPSE), mudança de área fracional (FAC), fração de encurtamento (FS), índice de *performance* do miocárdio (MPI), razão entre a velocidade máxima da ejeção rápida de lenta pela valva tricúspide (E/A), razão entre o tempo de aceleração e ejeção pela valva pulmonar (AT/ET), pela ecocardiografia transtorácica, e sobre a morfometria do ventrículo direito.

3.2.2 Objetivos específicos – experimento II

1. Verificar a resistência vascular pulmonar e os efeitos do exercício físico aeróbio sobre este desfecho no modelo experimental de *Cor pulmonale*;
2. Avaliar a pressão na artéria pulmonar e a influência do exercício físico aeróbio sobre este desfecho no modelo experimental de *Cor pulmonale*;
3. Mensurar as concentrações de peróxido de hidrogênio no VD e verificar a influência do exercício físico aeróbio sobre este desfecho em ratos com *Cor pulmonale*;
4. Avaliar a influência do exercício físico aeróbio sobre o imunoconteúdo de proteínas pró-apoptóticas (Bax e caspase-3) e anti-apoptóticas (Bcl-2) no ventrículo direito de ratos com *Cor pulmonale*;
5. Verificar a influência do exercício físico aeróbio sobre o imunoconteúdo de proteínas envolvidas com a proliferação e sobrevivência celular (PI3K, Akt total e p-Akt) no ventrículo direito de ratos com *Cor pulmonale*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos deste estudo estão de acordo com a Lei Arouca (Lei nº 11.794), com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos, de 2013, e com as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA – 2013 (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL). Este trabalho foi aprovado pela Comissão de

Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (número de aprovação 21398).

4.2 Desenho Experimental - Experimento I

Para o experimento I foi testada a hipótese I, a qual versava sobre o papel positivo do exercício físico aeróbio sobre a sinalização para a angiogênese no parênquima pulmonar. Ademais, foi avaliada a repercussão dessas alterações moleculares sobre a função ventricular direita avaliada por ecocardiografia.

Para a consecução dessa proposta, foram utilizados trinta e dois ratos Wistar machos (com 315 ± 34 gramas no final dos procedimentos experimentais), advindos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CREAL-UFRGS). Os animais receberam água e comida *ad libitum* e ficaram alojados em uma temperatura que variava entre 20-25 °C e umidade controlada em 70%, com um ciclo claro/escuro padronizado de 12 h. Os animais foram divididos em quatro grupos: 1) controle sedentário (SC), animais que não receberam monocrotalina e não participaram do protocolo de exercício físico aeróbio; 2) controle treinado (TC), animais que não receberam a monocrotalina mas participaram do protocolo de exercício físico aeróbio; 3) monocrotalina sedentário (SM), animais que receberam a monocrotalina e não participaram do protocolo de exercício físico aeróbio e 4) monocrotalina treinado (TM), animais que receberam a monocrotalina e participaram do protocolo de exercício físico aeróbio.

Os animais dos grupos TC e TM realizaram o protocolo de exercício físico aeróbio, que consistia de cinco sessões de treinamento, pelo período de cinco semanas consecutivas (COLOMBO et al., 2013). Os animais iniciaram o treinamento em esteira adaptada para roedores (Imbramed TK-01, Porto Alegre, Brasil) com um período de pré-treinamento que durou duas semanas. Este período iniciou com uma sessão a 0,6 km/h e duração de 15 minutos. Ao final da segunda semana, os animais realizavam uma sessão a 0,9 km/h por 60 minutos. Tanto a intensidade quanto a duração do treinamento aeróbio foram progressivos durante as duas primeiras semanas de treinamento (SOUZA-RABBO et al., 2008). Vinte e quatro horas após a última sessão de treinamento da segunda semana de exercício aeróbio, os animais dos grupos SM e TM, receberam uma única injeção de monocrotalina (MCT) (60 mg/kg i.p.). Os animais dos grupos SC e TC receberam o mesmo volume de solução salina (NaCl 0,9% i.p.) (FARAHMAND; HILL; SINGAL, 2004). Um dia (24 horas) após a injeção, os animais dos grupos TC e TM realizaram um teste de velocidade máxima, estabelecido por Rodrigues *et al.*, que teve como objetivo o reajuste da intensidade de treinamento (60% do consumo máximo de oxigênio) (RODRIGUES et al., 2007). Um dia (24 horas) após o teste de velocidade máxima, os animais iniciaram a segunda parte do protocolo de exercício físico aeróbio, que consistia de três semanas consecutivas, a uma intensidade de 60% do consumo máximo de oxigênio, duração de 50-60 minutos, por cinco vezes na semana. Ao final da segunda semana, os animais dos grupos TC e TM repetiram o mesmo teste de velocidade máxima, e a velocidade foi reajustada com o objetivo de manter a mesma intensidade de trabalho (60% do consumo máximo de oxigênio). Vinte e quatro horas após a última sessão de

treinamento aeróbio, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (90 mg/kg i.p.) e xilazina (10 mg/kg i.p.), foi realizada a avaliação ecocardiográfica do ventrículo direito e artéria pulmonar, e os animais foram eutanasiados por deslocamento da coluna cervical, ainda sob os efeitos do anestésico geral.

4.2.1 Avaliação ecocardiográfica

O treinamento para a padronização da técnica de avaliação funcional do ventrículo direito através da ecocardiografia foi realizada na Universidade Federal de São Paulo, no Laboratório de Cardiologia Experimental, sob a supervisão do Prof. Dr. Paulo José Ferreira Tucci e do Prof. Dr. Jairo Montemor Augusto Silva.

As imagens foram obtidas através do modo bidimensional, modo M e do doppler pulsado (Sistema de Ultrassom Philips HD7, Andover, MA, USA), utilizando um transdutor piezoelétrico setorial S12-4 (Philips, Andover, MA, USA). Os seguintes parâmetros foram avaliados: o débito cardíaco do ventrículo direito (CO), o volume sistólico do ventrículo direito (SV), a excursão sistólica do plano do anel da tricúspide (TAPSE), a fração de encurtamento do ventrículo direito (FS), a mudança de área fracional do ventrículo direito (FAC), o índice de performance do miocárdio (MPI), a relação entre o tempo de aceleração e o tempo de ejeção do fluxo de sangue pela artéria pulmonar (AT/ET) e a relação entre a velocidade máxima do enchimento rápido e lento do ventrículo direito (E/A) (RUDSKI et al., 2010; URBONIENE et al., 2010).

Os seguintes cálculos foram realizados:

1. $SV = PA_{csa} (2D) \times VTI (doppler)$, $CO = SV \times HR$

$$2. PA_{csa} = (PA_d/2)^2 \times 3,14$$

Onde, PA_{csa} é a área de secção transversal da artéria pulmonar; HR é a frequência cardíaca medida no momento de fluxo pela artéria pulmonar; e PA_d é o diâmetro da artéria pulmonar durante a sístole ventricular.

1. FAC = (área diastólica final do VD – área sistólica final do VD/área diastólica final do VD) x 100
2. FS = (diâmetro diastólico final do VD – diâmetro sistólico final do VD/diâmetro diastólico final do VD) x 100
3. MPI = (tempo de fechamento da valva tricúspide – tempo de ejeção pela artéria pulmonar)/tempo de ejeção pela artéria pulmonar

4.2.2 Análise morfométrica

Após a avaliação ecocardiográfica, os animais foram eutanasiados ainda sob os efeitos da anestesia com cloridrato de cetamina e xilazina. Os corações e pulmões foram rapidamente removidos, e a hipertrofia do VD foi avaliada pela relação entre a massa do VD/massa corporal (mg/g) e massa do VD/massa do ventrículo esquerdo (mg/mg) (FARAHMAND; HILL; SINGAL, 2004). O pulmão direito foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido para as avaliações moleculares e bioquímicas. O pulmão esquerdo foi imerso em solução de paraformaldeído (4%) para a execução das análises histológicas e imuno-histoquímicas.

4.2.3 Concentração de peróxido de hidrogênio no parênquima pulmonar

O ensaio foi baseado na oxidação do vermelho de fenol mediada pela peroxidase de rabanete e pelo peróxido de hidrogênio. As amostras de pulmões foram homogeneizadas em cloreto de potássio (1,15% w/v) e fenilmetil-sulfonil-fluoreto (PMSF 20 mmol/L), e centrifugadas (1000 x g, durante 20 minutos, a 0 °C, a 4 °C). Os sobrenadantes foram usados para as análises posteriores. Foi construída uma curva padrão com concentrações variadas de peróxido de hidrogênio de 10, 20 e 30 (nmol/L). Após a adição do peróxido de hidrogênio na curva padrão e dos sobrenadantes dos homogeneizados nos poços da microplaca, o experimento continuou com a adição do tampão PRS (*phenol red solution*). Depois de adicionar o tampão PRS, a microplaca foi agitada à temperatura ambiente durante 25 min. Em cada poço com amostra, foi adicionado 1 mol/L de hidróxido de sódio (NaOH). Em seguida, a leitura foi realizada a 610 nm, e a concentração de peróxido de hidrogênio no parênquima pulmonar foi expressa em nmol/g de tecido (PICK; KEISARI, 1980).

4.2.4 Peroxidação lipídica – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

A peroxidação lipídica foi avaliada colorimetricamente através da mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizando o método previamente descrito por Ohkawa et al., (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979). Os homogeneizados foram misturados a 0,75 mL a 20% de TCA [m/v], e em seguida realizou-se a centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos. O ácido tiobarbitúrico (0,67% [m/v]) foi adicionado a uma alíquota (0,5

mL) do sobrenadante e a mistura foi aquecida num banho com água fervente durante 15 min. A absorbância foi mensurada em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 535 nm. Os resultados foram expressos em nmol de TBARS/mg de proteína, utilizando-se o coeficiente de extinção do malondialdeído ($156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

4.2.5 Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi avaliada com base na inibição da reação de radicais superóxido com o pirogallol, medido a um comprimento de onda de 420 nm. A atividade dessa enzima foi expressa em unidades por miligrama de proteína (MARKLUND; MARKLUND, 1974). A atividade da enzima catalase (CAT) foi medida através do decréscimo na absorbância do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), no comprimento de onda de 240 nm. A sua atividade foi expressa em nanomoles de H_2O_2 reduzidos por minuto por mg de proteína (AEBI, 1984). A atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) foi baseada no consumo da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), e foi medida pela absorbância a um comprimento de onda de 340 nm. A atividade foi expressa como nanomoles de peróxido/hidroperóxido reduzidas por minuto por miligrama de proteína (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984).

4.2.6 Análise por Western Blot

Os pulmões foram homogeneizados em um homogeneizador (Ultra-Turrax, Bosch, Atibaia, SP, Brasil) utilizando-se um tampão de lise celular (10x)(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EUA), diluído em água Mili-Q e

PMSF. A suspensão foi centrifugada a 8000 x g, durante 15 minutos, a 4 °C. Quarenta e oito microgramas (ug) de proteína foram utilizados para uma eletroforese unidimensional em SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (ARAÚJO et al., 2006; LAEMMLI, 1970). As proteínas separadas durante a eletroforese foram transferidas para membranas de polivinilideno difluoreto (PVDF), da empresa Bio-Rad (Bio-Rad, São Paulo, SP, Brasil). As membranas foram processadas por imunodeteção, utilizando os seguintes anticorpos primários: anticorpo anti-PI3K, anti-Akt 1/2/3, anti-p-Akt 1/2/3, anti-PTEN, anti-SOD, anti-CAT, anti-GPx, anti-Prx and anti-VEGF. Todos os anticorpos foram obtidos da empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). A ligação dos anticorpos primários foi detectada com anticorpos secundários conjugados à peroxidase de rabanete. As membranas foram reveladas a partir da utilização de reagentes para detecção por quimiluminescência. As autoradiografias foram analisadas com o programa ImageJ (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, EUA). A densidade óptica (DO) de cada amostra foi normalizada de acordo com o imunoc conteúdo de α -actinina.

A concentração de proteínas no parênquima pulmonar foi determinada pelo método de Lowry, utilizando albumina de soro bovino como referência (LOWRY et al., 1951).

4.2.7 Avaliação histológica

A análise histológica e imunohistoquímica foi realizada pelos médicos patologistas Alessandra Guerra Eifler de Godoy e Isnard Elman Litvin. Essa

análise foi fruto de uma parceria entre o Laboratório de Fisiologia Cardiovascular – UFRGS e o Instituto de Pesquisas Clínicas para Estudos Multicêntricos, da Universidade de Caxias do Sul.

Os tecidos provenientes do pulmão, previamente fixados em paraformaldeído, foram processados pelo método de rotina de embebição em parafina. Foram preparados cortes histológicos de 3 micrômetros de espessura, utilizando-se coloração pela Hematoxilina-Eosina (HE) com posterior análise por microscopia óptica convencional, em microscópio Nikon Eclipse 300, realizada por dois médicos patologistas em separado.

4.2.8 Análise imunohistoquímica

Foi realizada a metodologia para imunohistoquímica previamente padronizada. Os resultados foram obtidos através de microscópio óptico (Nikon Eclipse 300) e câmera digital (DS-5M-L1; Nikon, NY, USA), acoplados.

No material histopatológico (blocos de parafina com amostras de pulmão) foi realizado o método de imunohistoquímica por sistema semiautomatizado da Dako, utilizando-se os anticorpos anti-VEGF, anti-Ang-1 e anti-Tie-2, seguindo instruções do fabricante (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). Cortes teciduais com espessura de 5 µm foram montados sobre lâminas preparadas com solução de ATPS (3-aminopropiltriétoxisileno; Sigma-Aldrich) a 5 %, em acetona PA, sendo mantidas em estufa (50 °C) durante 1 h, para fixação dos cortes. Após fixação, os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados por passagens sucessivas em etanol, em concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90 %, 80 % e 70 %). Com o objetivo de eliminar reações inespecíficas falso-positivas, foi realizado o bloqueio da

peroxidase endógena. Para tanto, as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio 1,5 % e metanol absoluto (v/v), por 20 minutos, com posterior lavagem com água destilada. Previamente à incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram submetidas ao tratamento para reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação em formol e inclusão do tecido em parafina. Para este fim, foi utilizada uma solução composta por 180 mL de ácido cítrico 0,1 mol/L e 820 mL de citrato de sódio 0,1 mol/L (pH 6,0). As lâminas foram imersas nesta solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água destilada e mantidas em banho-maria ajustado para 95 – 98 °C, durante 45 min. Logo após, ainda como parte do processo térmico de reativação antigênica, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 minutos em temperatura ambiente e lavadas em água destilada. Após a lavagem das lâminas, as mesmas serão submersas em tampão PBS.

A imunodeteção foi realizada utilizando anticorpos monoclonais anteriormente citados. A solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes teciduais. Após lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG/IgM conjugado com um polímero de peroxidase (En Vision Plus; Dako Cytomation) em câmara úmida. As amostras foram submetidas a uma revelação colorimétrica com kit comercial (Dako Cytomation), através de uma solução cromógena contendo 0,03 % de 3,3'-diaminobenzidina (3,3,4,4'-tetraaminobifeniltetraidrocloro), previamente diluída em tampão imidazol (pH 7,2) e peróxido de hidrogênio a 0,3 %. Após a revelação, foi realizada a contra-coloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris, desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol

(etanol 70 %, 80 %, 90 % e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em Entellan (Merck, SP, Brasil). Para cada reação foram utilizados controles negativo e positivo. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse 300) e câmera digital (DS-5M-L1; Nikon, NY, USA), acoplados.

4.2.9 Análise estatística

Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* 17.0 (SPSS 17.0). O tamanho da amostra (n) foi calculado *a priori*, a partir de dados obtidos a partir da literatura, considerando-se um valor $\alpha = 0,05$ e um poder estatístico de 80% ($\alpha = 0,8$). O desfecho utilizado para o cálculo do tamanho amostral foi a medida de lipoperoxidação por TBARS. O valor do n obtido para cada análise é indicado nas figuras e tabelas de forma individual. Os resultados são apresentados como médias \pm DP. As comparações entre os dados paramétricos foram realizadas por análise de variância de duas vias (ANOVA *two-way*), com teste complementar *post-hoc* de *Bonferroni*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando a probabilidade de erro alfa foi menor que 0,05 ($P\alpha < 0,05$). A relação entre a concentração de peróxido de hidrogênio e o imunoconteúdo do VEGF no parênquima pulmonar foi avaliada utilizando o coeficiente de correlação de *Pearson*.

4.3 Desenho Experimental - Experimento II

A sequência metodológica do experimento II é exatamente a mesma do experimento I (Item 4.2). Para a análise dos desfechos apresentados abaixo, foram utilizados 28 ratos Wistar machos, pesando 146 ± 16 gramas ao final do

procedimento experimental. Ao final do período de treinamento aeróbio, os animais foram anestesiados com quetamina (90 mg/kg i.p.) e xilazina (10 mg/kg i.p.), foi realizado o cateterismo do ventrículo direito e a avaliação ecocardiográfica. Após a ecocardiografia, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, ainda sob os efeitos da anestesia geral. Após a eutanásia, o coração foi imediatamente retirado, as câmaras cardíacas foram separadas, pesadas e congeladas em nitrogênio líquido.

4.3.1 Avaliação ecocardiográfica

Para a análise ecocardiográfica foi utilizado o sistema de Ultrassom Philips HD7 (Andover, MA) com um transdutor linear de 12 a 13 MHz, para imagens a 3 cm de profundidade. A resistência vascular pulmonar (RVP) foi medida pela relação entre o tempo tempo de aceleração e o tempo de ejeção do fluxo sanguíneo pela artéria pulmonar (AT/ET) (JONES et al., 2002).

4.3.2 Avaliação hemodinâmica

Para os registros hemodinâmicos a veia jugular de cada animal foi exposta e um cateter de polietileno (PE-50) com solução salina (NaCl 0,9%) foi introduzido no átrio direito e no ventrículo direito. A pressão sistólica do ventrículo direito (RVSP) foi monitorada através de um transdutor de pressão (Strain Gauge - Narco Biosystem Pulse Miniature Tansducer PR-155, Houston, TX - EUA) conectado a um amplificador de sinal (amplificador de pressão HP 8805C) (SOUZA-RABBO et al., 2008a). Os dados foram digitalizados (Windaq, sistema de aquisição de dados, PC, Akron, Ohio - EUA) em uma faixa de 1.000 Hz de frequência e expressos em mmHg. Para estimar a pressão arterial

pulmonar (PAP), a seguinte fórmula foi usada: PAP (em mmHg) = 0,61 x PAP sistólica + 2. A pressão sistólica do ventrículo direito (RVSP) foi utilizada a fim de estimar a pressão arterial sistólica na artéria pulmonar. Sabe-se que a PSVD é semelhante à pressão sistólica na artéria pulmonar, justificando a sua utilização na fórmula descrita acima (KOSKENVUO et al., 2010).

4.3.3 Análise morfométrica

Após a avaliação ecocardiográfica, os animais foram eutanasiados ainda sob os efeitos da anestesia com quetamina e xilasina. O coração foi rapidamente removido, e a hipertrofia do VD foi avaliada pela relação entre a massa do VD/massa corporal (mg/g), massa do VD/massa do ventrículo esquerdo (mg/mg) e massa do VD/comprimento da tíbia (mg/mm) (FARAHMAND; HILL; SINGAL, 2004). Após a pesagem, os corações foram rapidamente congelados em nitrogênio para as análises bioquímicas e moleculares posteriores.

4.3.4 Concentração de peróxido de hidrogênio no ventrículo direito

A concentração de peróxido de hidrogênio no ventrículo direito dos animais dos diferentes grupos experimentais foi realizada de acordo com o método descrito no item 4.2.3.

4.3.5 Análise por Western Blot

A análise por Western Blot foi realizada seguindo o mesmo procedimento experimental detalhado no item 4.2.6. Os anticorpos primários

utilizados para o experimento II foram: Anti-PI3K, anti-Akt 1/2/3, anti-p-Akt 1/2/3, anti-Bax, anti-Bcl2 and anti-caspase 3, todos os anticorpos obtidos da empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). A densidade óptica de cada amostra foi normalizada de acordo com o imunoconteúdo da proteína β -tubulina.

4.3.6 Análise Estatística

Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* 17.0 (SPSS 17.0). O tamanho da amostra (n) foi calculado *a priori*, a partir de dados obtidos a partir da literatura, considerando-se um valor $\alpha = 0,05$ e um poder estatístico de 80% ($\alpha = 0,8$). O desfecho utilizado para o cálculo do tamanho amostral foi a concentração de peróxido de hidrogênio. O valor do n obtido para cada análise é indicado nas figuras e tabelas de forma individual. Os resultados são apresentados como médias \pm DP. As comparações entre os dados paramétricos foram realizadas por análise de variância de duas vias (ANOVA *two-way*), com teste complementar *post-hoc* de *Bonferroni*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando a probabilidade de erro alfa foi menor que 0,05 ($P\alpha < 0,05$). A relação entre a concentração de peróxido de hidrogênio e o imunoconteúdo do VEGF no parênquima pulmonar foi avaliada utilizando o coeficiente de correlação de *Pearson*.

5. RESULTADOS

5.1 Resultados artigo I

Status do artigo: Artigo a ser submetido

Objetivo: Avaliar a influência do exercício aeróbio sobre o sinal angiogênico pulmonar dependente de H₂O₂/VEGF/p-Akt no modelo experimental de *Cor pulmonale*.

Título: AEROBIC EXERCISE CONTRIBUTES TO H₂O₂/VEGF SIGNALING IN THE RAT LUNG WITH PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION

Rafael Colombo¹; Rafaela Siqueira¹; Adriana Conzatti¹; Bruna Gazzi de Lima¹; Tânia Regina Gattelli Fernandes¹; Alessandra Eifler Guerra Godoy²; Isnard Elman Litvin²; Jairo Montemor Augusto Silva³; Paulo José Ferreira Tucci³; Alexander da Rosa Araújo¹, Adriane Belló-Klein¹

Affiliations

¹ Laboratory of Cardiovascular Physiology and Reactive Oxygen Species – Federal University of Rio Grande do Sul

² Caxias do Sul University - Research Institute for Multicenter Studies (IPCEM-UCS)

³ Laboratory of Cardiac Physiology and Pathophysiology - Federal University of São Paulo

Running title: Aerobic exercise and H₂O₂/VEGF signalling in pulmonary arterial hypertension

Corresponding author: Dr. Adriane Belló-Klein

Work telephone number: 051-33083621

Email addresses:

Rafael Colombo: ralombo@hotmail.com

Rafaela Siqueira: rafaela_siqueira@yahoo.com.br

Adriana Conzatti: driconzatti@gmail.com

Bruna Gazzi de Lima: bruna.gazzi@hotmail.com

Tânia Regina Gattelli Fernandes: taniaufrgs@yahoo.com.br

Alessandra Eifler Guerra Godoy: aeggodoy@gmail.com

Isnard Elman Litvin: jelitvin@ucs.br

Jairo Montemor Augusto Silva: jairo.montemor@gmail.com

Paulo José Ferreira Tucci: tucci@fcr.epm.br

Alex Sander da Rosa Araújo: alsanderaraujo@hotmail.com

Adriane Belló-Klein: belklein@ufrgs.br

Abstract

Aims

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by pulmonary vascular remodelling and right ventricle overload. Given that angiogenesis is a key factor involved in the reduction of vascular resistance to blood flow, it was tested the hypothesis that aerobic exercise affects H₂O₂/VEGF/p-Akt signaling in lung parenchyma and right ventricle function by echocardiography.

Methods and Results

To study the effects of aerobic exercise on lung angiogenesis signalling, Wistar rats were administered monocrotaline (MCT) (60 mg/kg i.p.) or the same

volume of saline (0.9% NaCl i.p.). There was an increase in H₂O₂ in trained monocrotaline (TM) compared to sedentary monocrotaline (SM). H₂O₂ showed a positive correlation with vascular endothelial growth factor (VEGF). VEGF was higher in TM animals compared to SM. VEGF and angiopoietin-1 (Ang-1) showed positive staining in the lung parenchyma of TM and SM. Glutathione peroxidase showed higher activity in the TM group compared to trained control (TC). Aerobic exercise increased the immunocontent of peroxiredoxin (P < 0.05). The increase in VEGF was positively correlated with Akt phosphorylation. p-Akt was shown to be increased in TM animals when compared to SM animals (2.5 fold). The change in fractional area, fractional shortening and systolic tricuspid annular plane excursion showed improvement after exercise training.

Conclusion

Aerobic exercise promotes H₂O₂/VEGF/p-Akt signalling for pulmonary physiological angiogenesis. It is associated with an improvement in RV function, as evaluated by echocardiography.

Key words: monocrotaline, oxidative stress, angiogenesis, right ventricle, echocardiography.

INTRODUCTION

Administration of the drug pyrrolizidine alkaloid monocrotaline at specific doses can cause pulmonary arterial hypertension (PAH) due to pulmonary mononuclear vasculitis, which may in turn lead to right ventricular hypertrophy (RVH). ⁽¹⁾ PAH is a progressive and fatal disease characterized by vascular remodelling and pathological angiogenesis. Pathological angiogenesis is caused by hyperplasia and hypertrophy of the tunica media of arterioles,

resulting in the reduction or obliteration of its lumen, increased afterload imposed on the right ventricle (RV) and progression to right heart failure (RHF).

(2)

Vascular remodelling is a complex process that varies over time and is dependent on coordinated biochemical events between endothelial cells and smooth muscle cells. ⁽²⁾ However, the molecular and cellular mechanisms that modulate angiogenesis in PAH are still not completely understood. The molecular signals leading to angiogenesis are dependent on the vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietins. Physiological angiogenesis is initiated by signals triggered by shear stress and hypoxia, causing an increase in the expression of VEGF and a change in the proteolytic balance, leading to degradation of the basement membrane and endothelial cell proliferation. The signal triggered by VEGF causes an increase in the expression of angiopoietin-1 (Ang-1), which binds to its membrane receptor (Tie-2), stimulating an intracellular signal for cell survival and nitric oxide (NO) synthesis. This intracellular signal seems to depend on phosphoinositide-3 kinase (PI3K)-protein kinase B (Akt). ⁽³⁾ Pathological angiogenesis shares many of the intracellular signals of physiological angiogenesis. However, VEGF and angiopoietins are also released by macrophages attracted by local inflammation. During inflammation, there is an increase in the release of angiopoietin-2 (Ang-2), which acts by antagonizing the effects of Ang-1, causing malformation, instability, apoptosis and luminal obliteration of vessels. ⁽²⁾⁽¹⁾

Among the mediators of angiogenesis, reactive oxygen species (ROS) are of particular interest. ROS can be produced under tissue hypoxia, enhancing the effect of angiogenic molecules such as VEGF and angiopoietins.

⁽⁴⁾ When produced chronically and at high concentrations, ROS can lead to tissue damage; when produced intermittently and at low concentrations, they are essential for cell growth and survival. ⁽⁵⁾ The main ROS involved in intracellular signalling for angiogenesis is hydrogen peroxide (H₂O₂). Due to its long half-life and free movement across cell membranes, this reactive species can increase the expression of VEGF and stimulate physiologic angiogenesis. ⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾ Many studies show that high concentrations of H₂O₂ can lead to endothelial injury; and low concentrations of this molecule stimulate angiogenesis and the maturation of normal preformed vessels. ⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾

Given that ROS are involved in the formation and maturation of new vessels, therapeutic strategies designed to maintain the balance between the production and metabolism of these reactive species can act beneficially on angiogenesis. It is known that aerobic exercise acts positively on oxidative stress in an experimental model of *Cor pulmonale*, decreasing hydrogen peroxide concentrations and lipid peroxidation in RV. ⁽¹¹⁾⁽¹²⁾ Furthermore, exercise reduces circulating levels of monocytes and the expression of inflammatory genes such as tumour necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin 6 (IL-6), and also decreases the recruitment of additional macrophages to the inflammation site. ⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾ These beneficial responses stimulated by aerobic exercise can minimize the pulmonary vascular inflammation generated by monocrotaline, decreasing the production of ROS and optimizing the signalling for physiologic angiogenesis.

The main objective of this study was to evaluate the modulatory role of aerobic exercise on oxidative stress, as well as changes in signalling for pulmonary angiogenesis. At the same time, it sought to assess the impact of

neovascularization on right ventricular function in an experimental model of PAH.

METHODS

Ethical approval

All procedures in this study were in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication, 8th Edition, 2011). This study was approved by Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Rio Grande do Sul (approval number 21398).

Experimental design

Thirty-two male Wistar rats (315 ± 34 g at the end of experimental procedures) from the Center of Reproduction and Experimentation of Laboratory Animals at the Federal University of Rio Grande do Sul received water and food *ad libitum* and were housed in a temperature (20–25°C) and humidity (70%) controlled environment with a regulated light/dark cycle of 12 h. Animals were divided into four groups: 1) sedentary control (SC), animals that did not receive monocrotaline and were not involved in the aerobic exercise protocol; 2) trained control (TC), animals that did not receive monocrotaline but participated in the aerobic exercise protocol; 3) sedentary monocrotaline (SM), animals that received monocrotaline and were not involved in the aerobic exercise protocol and 4) trained monocrotaline (TM), animals that received monocrotaline and participated in the aerobic exercise protocol.

Animals in the TC and TM groups were subjected to an aerobic exercise protocol that consisted of five daily sessions held for five weeks. ⁽¹²⁾ Two weeks of training were performed on a treadmill (Imbramed TK-01, Porto Alegre, Brazil) adapted for rodents. Each training session in this period started with 15 min at 0.6 km/h and finished with a session of 60 min at 0.9 km/h. ⁽¹¹⁾ At the end of the second week of training, the monocrotaline groups (SM and TM) received a single injection of monocrotaline (MCT) (60 mg/kg i.p.) or the same volume of saline (SC and TC groups). ⁽¹⁵⁾ On the day after injection, the animals underwent the maximum speed test, performed according to Rodrigues et al, in order to readjust the workload imposed (60% of maximal oxygen consumption). ⁽¹⁶⁾ Twenty-four hours after the test, the animals started three weeks of exercise training. At the end of the second week of training, the maximum speed test was repeated and, at the end of the third week, the animals were anaesthetized with ketamine (90 mg/kg i.p.) and xylazine (10 mg/kg i.p.), and final echocardiography was performed.

Echocardiographic assessment

Images were obtained through the two-dimensional mode, M-mode and pulsed wave Doppler (Philips HD7 Ultrasound System, Andover, MA, USA), using a S12-4 transducer (Philips, Andover, MA, USA). The following parameters were assessed: stroke volume of RV (SV), cardiac output of RV (CO), tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE), RV fractional shortening (FS), fractional area change from RV (FAC), myocardial performance index of RV (MPI), relationship between acceleration time and the ejection time through the pulmonary artery (AT/ET), and the ratio between the flow during fast and slow emptying of RV (E/A). ⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾

Morphometric analysis

After echocardiography, the animals, still anaesthetized, were euthanized. The heart and lungs were quickly removed and RV hypertrophy was assessed according to the relationship between RV mass/body mass (mg/g) and right ventricular mass/left ventricular mass (mg/mg). The right lung was immediately frozen in liquid nitrogen for molecular and biochemical evaluations, and the left lung was immersed in paraformaldehyde solution (4%) for histological and immunohistochemical assessment.

Lung concentration of hydrogen peroxide

The assay was based on horseradish peroxidase-mediated oxidation of phenol red by hydrogen peroxide. The lung samples were homogenized in potassium chloride (1.15% w/v) and phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF 20 mmol/L), and centrifuged (1,000 x g for 20 min at 0° to 4°C). The supernatants were used for further analysis. A standard curve of hydrogen peroxide concentrations of 10, 20 and 30 ($\mu\text{mol/L}$) was also constructed. After adding hydrogen peroxide to the standard curve and the supernatants of the homogenates to microplate wells, the experiment was continued with phenol red dextrose buffer and incubation with horseradish peroxidase buffer (PRS). After adding the PRS buffer, the microplate was shaken at room temperature for 25 min. To each sample 1 mol/L of NaOH was then added, a reading was taken at 610 nm, and tissue hydrogen peroxide concentration was expressed as nmol/g of tissue. ⁽¹⁹⁾

Lipid peroxidation – thiobarbituric acid reactive substances

Lipid peroxidation was measured colorimetrically by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) using the method described by Ohkawa et al. ⁽²⁰⁾ The homogenate was mixed with 0.75 mL in 20% [w/v] TCA and then centrifuged at 3000 rpm for 5 min. Thiobarbituric acid (0.67% [w/v]) was added to an aliquot (0.5 mL) of the supernatant and the mixture heated in a boiling water bath for 15 min. Absorbance was measured in a spectrophotometer at 535 nm. The results were expressed as nmol of TBARS/mg of protein, using the malondialdehyde extinction coefficient ($156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Antioxidant enzyme activity

The activity of superoxide dismutase (SOD) was evaluated on the principle of the inhibition of superoxide radical reaction with pyrogallol, measured at 420 nm. It was expressed as units per milligram of protein. ⁽²¹⁾ Catalase activity was measured by following the decrease in hydrogen peroxide (H_2O_2) absorbance at 240 nm. It was expressed as nanomoles of H_2O_2 reduced per minute per mg of protein. ⁽²²⁾ The activity of glutathione peroxidase (GPx) was based on the consumption of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), and was measured at 340 nm. It was expressed as nmoles of peroxide/hydroperoxide reduced per minute per milligram of protein. ⁽²³⁾

Western blot analysis

The lungs were homogenized in a homogenizer (Ultra-Turrax, Bosch, Atibaia, SP, Brazil) with 10x cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) diluted in Mili-Q water and PMSF (phenylmethylsulphonyl

fluoride). The suspension was centrifuged at 8,000 x g for 15 min at 4°C. Forty-eight µg of protein were subjected to one-dimensional SDS-PAGE. ⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾ The separated proteins were transferred electrophoretically to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes in a cooled Bio-Rad TransBlot Unit (Bio-Rad, São Paulo, SP, Brazil). Membranes were processed for immunodetection using the following primary antibodies: anti-PI3K, anti-Akt 1/2/3, anti-p-Akt 1/2/3, anti-PTEN, anti-superoxide dismutase, anti-catalase, anti-glutathione peroxidase, anti-peroxirredoxin, anti-VEGF, anti-angiopoietin-1 and anti-Tie-2, all obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Binding of the primary antibodies was detected with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase, and membranes were developed using chemiluminescence detection reagents. The autoradiographs were analysed with ImageJ (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). The optical density (o.d.) results from each sample were normalized according to their immunocontent of α-actinin.

Protein content was determined by the Lowry method, using bovine serum albumin as a standard. ⁽²⁶⁾

Histological evaluation

The tissues from rat lungs were processed by soaking in paraffin. Histological sections of 3 µm were prepared using haematoxylin-eosin staining (HE) and analysed by light microscopy (Nikon Eclipse 300 microscope), by two pathologists independently.

Immunohistochemistry

The immunohistochemical method was performed in the semiautomated Dako system, using anti-VEGF, Ang-1 and Tie-2 antibodies. All antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Tissue sections were mounted with 5% ATPS solution (3-aminopropyltriethoxysilane; Sigma-Aldrich) diluted in acetone PA, and kept in a stove (50 ° C) for 1 h to fix the sections. Sections were deparaffinized and rehydrated. In order to eliminate non-specific false positive reactions, endogenous peroxidase blocking was performed. The slides were immersed in antigen reactivation solution (diluted 1:10), and kept in a water bath (95–98°C) for 45 min. Afterwards, slides were removed from the water bath, maintained for 20 minutes at room temperature and washed with distilled water. After washing, the slides were submerged in PBS buffer.

Immunodetection was performed using the monoclonal antibodies mentioned above. After washing, slides were incubated with secondary antibody anti-IgG/IgM conjugated with horseradish peroxidase (En Vision Plus, Dako Cytomation). Samples were submitted to colorimetric development with a commercial kit (Dako Cytomation), previously diluted in imidazole buffer (pH 7.2) and 0.3% hydrogen peroxide. After exposure, counter-staining of slides was conducted with *Harris* haematoxylin solution, dehydrated by passage of the slides in increasing concentrations of ethanol, xylene diafanization and mounting in Entellan (Merck, SP, Brazil). Negative and positive controls were used for each reaction. The slides were analysed by optical microscope (Nikon Eclipse 300) and digital camera (DS-5M-L1, Nikon, NY, USA).

Statistical analysis

All statistical tests were carried out using the Statistical Package for the Social Sciences 17.0 software (SPSS 17.0). The sample size (n) was calculated a priori from data obtained from the literature, considering $\alpha = 0.05$ and a statistical power of 80% ($\alpha = 0.8$). The value of n obtained for each analysis is indicated in individual figures and tables. Results are presented as means \pm SD. Comparisons among parametric data were performed by two-way analysis of variance, with complementary post-hoc *Bonferroni* test. Differences were considered statistically significant when the alpha error probability was less than 0.05 ($P < 0.05$). The relationship between hydrogen peroxide concentration and VEGF immunocontent in lung parenchyma was tested using *Pearson* correlation coefficients.

RESULTS

Lung concentration of hydrogen peroxide

Hydrogen peroxide (H_2O_2) is a ROS involved in intracellular, physiological and pathological signalling to angiogenesis. The H_2O_2 concentration in the lung parenchyma of TM rats was higher than in the SM group (43%; 145.0 ± 37.4 and 101.7 ± 28.5 nmol/g, respectively) and TC group (51%; 145.0 ± 37.4 and 96.4 ± 10.3 , respectively) (Figure 1A).

Lipid peroxidation – thiobarbituric acid reactive substances

Thiobarbituric acid reactive substances are formed from lipid peroxidation and are considered important markers of oxidative damage to

biological membranes. There were no statistical changes in relation to this outcome among the different experimental groups (Figure 1B).

Antioxidant enzyme activity and immunocontent

By maintaining cellular redox state and reducing major intracellular oxidants, antioxidant enzymes play an important role in the modulation of ROS-dependent angiogenic signalling. Superoxide dismutase (SOD) is responsible for the conversion of the superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) to H_2O_2 . Its activity (Fig. 2A) and immunocontent (Figure 2B) did not differ significantly among the experimental groups. However, catalase (CAT), which is responsible for the reduction of H_2O_2 to water (H_2O), showed reduced activity (39%) (Figure 2C) and immunocontent (35%) (Figure 2D) in SM animals when compared to SC. The TM animals showed no significant difference in the activity and immunocontent of this enzyme when compared to TC. Glutathione peroxidase is responsible for the detoxification of organic and inorganic peroxides, reducing H_2O_2 to water, via the oxidation of reduced glutathione (GSH). The activity of this enzyme was higher in TM animals compared to TC (49%) (Figure 2E). It was noted that the content of peroxiredoxin (Prx), an enzyme that acts on the reduction of H_2O_2 , when in low concentrations, did not differ among the experimental groups (Fig. 2F). Nevertheless, aerobic exercise (TC and TM) increased the immunocontent of this enzyme compared to sedentary animals (SC and CS) ($P < 0.05$).

Angiogenic labels – immunocontent and immunohistochemistry

To test the hypothesis that exercise works by stimulating pulmonary angiogenesis, the influence of peptides involved in signalling for this process

was investigated. There was a marked increase in VEGF immunocontent in TM animals compared to SM (4.7 fold; 35.5 ± 10.7 and 8.3 ± 7.1 , respectively) and TC (14.6 fold; 35.5 ± 10.7 and 2.4 ± 1.2 , respectively) (Figure 3A). Similarly, positive staining of VEGF in lung tissue sections was observed in SM and TM groups (Figure 3B). Moreover, VEGF immunocontent was positively correlated with H_2O_2 and p-Akt immunocontent ($r = 0.77$, $P < 0.05$ and $r = 0.73$, $P < 0.05$, respectively) (Figure 5A and 5B, respectively). One of the physiological signals involved in angiogenesis and maturation of the new vessel may be mediated by the binding of angiopoietin-1 (Ang-1) to its tyrosine kinase receptor (Tie-2). Immunohistochemical positive staining of Ang-1 was observed in SM and TM lung sections (Fig. 3C). However, no differences in Tie-2 were identified by immunohistochemistry staining (Fig. 3D). After binding to its receptor, Ang-1 stimulates the survival signalling of the new vessels. This pathway is dependent on phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (Akt) activation. PI3K was significantly lower in animals receiving monocrotaline (SM and TM) compared to saline (SC and TC) ($P < 0.05$) (Figure 3E). The enzyme phosphatase and tensin homolog (PTEN) operates dephosphorylating phosphatidylinositol (3,4,5) – trisphosphate, inhibiting Akt-dependent signalling. An increase in PTEN immunocontent was observed in TM animals compared to SM (3.2 fold; 21.9 ± 4.5 and 6.9 ± 1.3 , respectively) and TC (3.2 fold; 21.9 ± 4.5 and 6.9 ± 2.9) (Figure 3F). The Akt immunocontent was lower in animals that received monocrotaline (SM and TM) compared to saline (SC and TC) ($P < 0.05$). The immunocontent of this protein was lower in SM (82%) when compared to SC (19.1 ± 2.8 and 3.4 ± 2.1), and lower in TM (88%) compared to TC (24.4 ± 5.6 and 2.9 ± 1.5) (Figure 3G). When phosphorylated, Akt is a key protein involved

in cell survival. p-Akt was higher in TM animals when compared to SM (2.5 fold; 23.1 ± 6.5 and 9.1 ± 4.1) and TC (2.8 fold; 23.1 ± 6.5 and 8.0 ± 3.3) (Figure 3H). The presence of macrophages (Figure 4A) and inflammatory infiltrate (Figure 4B) in the lung parenchyma was noted in all experimental groups.

Morphometric analysis

In this PAH model created by monocrotaline injection, RV hypertrophy after 21 days of injection is a classic response. In monocrotaline animals (SM and TM), there was an increase in right ventricle/left ventricle ratio (RV/LV g/g) compared to control animals (SC and TC) ($P < 0.05$). There was a similar response in the RV/body weight ratio (RV/BW g/g) ($P < 0.05$). However, aerobic exercise did not attenuate RV hypertrophy in TM animals (Table 1).

Echocardiographic data

Monocrotaline works by increasing the afterload imposed on the RV, stimulating hypertrophy, which may progress to right heart failure. Thus, it is essential to assess by echocardiography the effect of exercise on cardiac function after monocrotaline injection. All echocardiographic data are presented in Table 1. The acceleration time/ejection time ratio (AT/ET) was lower in monocrotaline-treated animals (SM and TM) compared to saline-treated animals (SC and TC) ($P < 0.05$). Aerobic exercise was unable to reduce the pressure overload (Figure 5A). The RV systolic volume (SV) was lower in SM animals than SC animals (41%; $00:42 \pm 0.1$ to 0.25 ± 0.1). In TM, systolic volume did not differ significantly from their respective control (TC). The cardiac output of RV (CO) did not differ significantly among the experimental groups. However, the fractional area change (FAC) of the RV was lower in SM

compared to SC (52%; 62.0 ± 4.9 and 29.9 ± 5.9). In TM, there was an increase in FAC compared to SM animals (68%; 50.5 ± 8.1 and 29.9 ± 5.9), showing that exercise acted positively on this outcome (Figure 5B). The E/A ratio is indicative of RV diastolic function. It was significantly lower in SM animals than SC animals (21%, 0.79 ± 0.07 to 0.63 ± 0.12), but the ratio in TM animals did not differ from that in other experimental groups, showing that aerobic exercise prevented the worsening of RV diastolic function in this PAH experimental model. The same response was observed for RV fractional shortening (FS), with a reduction in SM animals compared to the SC group (58%; 36.8 ± 0.1 and 15.6 ± 5.7). This outcome proved to be attenuated in the TM group, showing that exercise also acted positively on RV systolic function. The tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) allows the systolic function of the RV to be assessed through the movement of the tricuspid ring toward the ventricular apex. In relation to assessing the RV function, this is one of the main methods available in cardiovascular clinical practice. The TAPSE was found to be reduced after monocrotaline injection (SM and TM) compared to the respective control groups (SC and TC) ($P < 0.05$). However, in TM animals, TAPSE returned to the same values recorded in the SC group, showing that exercise minimizes the functional impairment of the RV in this PAH experimental model (Figure 6C) (Table 1).

DISCUSSION

The main finding of this work was a positive correlation between the levels of hydrogen peroxide and the classic signalling for VEGF-dependent angiogenesis in the lung parenchyma of animals with pulmonary arterial hypertension (PAH) who underwent aerobic exercise. Angiogenesis is an event

in which the collateral vessels that are formed show luminal expansion when compared to native vessels. The lumen of the new vessels can increase by 5 to 10 times, decreasing collateral blood flow resistance. It has also been noted that aerobic exercise has a beneficial impact on the function of the right ventricle. These facts may be associated with the improved survival of these animals observed in TM animals, as seen in a previous study published by our group. ⁽¹¹⁾

Aerobic exercise stimulates H₂O₂/VEGF-dependent angiogenic signalling

One of the objectives was to evaluate oxidative stress and the H₂O₂ concentration in the lung parenchyma and their effect on angiogenesis signalling in an experimental model of monocrotaline-induced PAH. ROS are signalling molecules that influence several cellular functions, such as proliferation, differentiation and apoptosis. Note that the action exerted by them is dose-dependent. ⁽²⁷⁾ At low concentrations (0.001 to 0.1 mM), H₂O₂ stimulates cell proliferation and physiological angiogenesis. However, it becomes apoptotic and is associated with pathological angiogenesis at concentrations of 0.7 mM and above. ⁽²⁸⁾

Intracellular H₂O₂ concentrations vary constantly throughout life, depending on the activity of enzymes involved in its reduction. Catalase (CAT) reacts with H₂O₂ at a second order reaction rate of $10^{-7} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, in an attempt to maintain its concentration within the normal range. ⁽²⁹⁾ In addition, intracellular H₂O₂ can react with thiols through the glutathione system. Glutathione peroxidase (GPx) uses a selenocysteine to reduce H₂O₂ to water, since peroxiredoxin (Prx), through its oxidation, catalyzes the conversion of peroxide

to water. ⁽²⁸⁾ Clearly, physiological angiogenesis is characterized by periods of high production of ROS, which are controlled by an efficient antioxidant defense system. Pathological angiogenesis occurs through uncontrolled ROS formation, causing the attraction of macrophages, which ultimately enhance the effect of oxidative stress on angiogenesis. ⁽³⁰⁾

In this study, there was an increase in lung H₂O₂ concentrations in animals with pulmonary arterial hypertension (PAH) that performed aerobic exercise (Figure 1A). As previously mentioned, H₂O₂ is closely associated with VEGF-dependent angiogenic signalling, as also illustrated in our study. These animals showed an increase in the immunocontent of VEGF (Figure 3A), as confirmed through the analysis of this protein by immunohistochemistry (Figure 3B). The *in vivo* correlation between these two events was assessed using the *Pearson* coefficient, showing that the concentrations of H₂O₂ and the VEGF immunocontent in lung parenchyma were significantly correlated ($r = 0.77$, $P < 0.05$) (Figure 5A). Furthermore, it is known that for the physiological event of angiogenesis, the production of and increase in ROS concentration must be transient. ⁽³⁰⁾ Notably, antioxidant enzymes have a positive impact on ROS, maintaining the redox state and beneficially influencing ROS-dependent intracellular signalling. It was noted that the activity of GPx was higher in TM animals than TC animals. Even without an increase in the activity of this enzyme, it could be suggested that GPx activity was influenced beneficially by exercise and that it could act by minimizing the pathological angiogenic signalling that could be triggered by high H₂O₂ (Figure 2E). CAT activity was lower in the SM group compared to SC, but in TM animals did not differ from that in the control groups (SC and TC) (Figure 2C). Analysis of this response

revealed that aerobic exercise may have minimized the worsening generated by monocrotaline in the activity of this enzyme, and that this response may be associated with maintaining an intermittent concentration of H₂O₂ in the lung parenchyma.

As previously mentioned, due to its stability and half-life, H₂O₂ is the main species involved in intracellular signalling. In a study published by Lili Chen et al., evidence suggests that increased production of H₂O₂, following an increase in the activity of Nox4 in endothelial cells, promotes angiogenesis through signals mediated by the increased expression of VEGFR2, cAMP-dependent kinase (AMPKA) and eNOS.⁽³¹⁾ Another study showed that quiescent endothelial cells produce an increase in H₂O₂ concentration, thus enhancing the angiogenic intracellular signal.⁽⁴⁾ Hydrogen peroxide-dependent intracellular signalling can influence the activity of endothelial cells. At low concentrations, H₂O₂ can induce VEGF expression, which in turn acts on PI3K and Akt, regulating the growth and survival of endothelial cells. Activation of PI3K leads to the formation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) into phosphatidylinositol-3,4,5 trisphosphate (PIP3), which in turn ultimately activates Akt.⁽³²⁾ When phosphorylated, Akt promotes the survival of endothelial cells and increases the production of nitric oxide (NO).⁽³⁾

Analysis of the phosphorylation of Akt in TM animals revealed a significant increase compared to the SM group (Figure 3H). Clearly, aerobic exercise was able to increase the phosphorylation of this important protein, which is involved in endothelial cell survival in PAH animals. However, in our study, the phosphorylation of Akt did not appear to be mediated by the classical PI3K/PIP3 signalling pathway. There was a reduction in PI3K immunocentent in

PAH animals, strengthening the hypothesis that phosphorylation of Akt was not mediated by PI3K (Figure 3E). In the TM group there was an increase in the immunoccontent of PTEN, a protein that is involved in the processing of PIP3 into PIP2, thereby inhibiting the PI3K/Akt pathway (Figure 3F). However, even with an increase in the immunoccontent of PTEN and without noticeable changes in relation to PI3K, it can be hypothesized that the signal for physiological angiogenesis was stimulated in PAH animals who underwent exercise, and that this outcome was strengthened by Akt. Importantly, after being trafficked to the plasma membrane, Akt can be phosphorylated by phosphoinositide-dependent like kinase-1 (PDK1) and protein mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2), completely activating Akt and stimulating its angiogenic action. Neither protein was evaluated in this work, making it impossible to infer which upstream proteins are involved in Akt phosphorylation.

Another important signal for endothelial cell survival appears to be influenced by the binding of Ang-1 to its tyrosine kinase receptor (Tie-2). This signal acts in the maintenance of vascular homeostasis and physiological maturation of new vessels, and in the control of angiogenesis and extracellular matrix adhesion. Vascular maturation is triggered by extracellular deposition of collagen type IV, the main component of vascular extracellular matrix, promoting its stabilization. ⁽³⁾ Thus, it is clear that Ang-1/Tie-2-dependent signalling is an important mediator of physiological angiogenesis. The molecular mechanisms involved in the beneficial responses mentioned above appear to be related to the activation of the Akt signalling pathway, in the same way as VEGF. The binding of Ang-1 to its receptor (Tie-2) ultimately phosphorylates Akt, which, through the inhibition of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β),

stimulates vascular stabilization. It is important to mention that in chronic vascular stress, chronic hypoxia and inflammation, it is common to note an increase in Ang-2 production, which acts by antagonizing the effects of Ang-1. In inflammatory situations, the increase in Ang-2 can destabilize the vascular endothelium and cause uncontrolled growth and loss of function of the new vessels. ⁽³³⁾⁽³⁾⁽³⁴⁾ In the current study, immunohistochemistry showed positive staining for Ang-1 in the TM and SM animals (Figure 3C). In the same way, it was observed a positive staining of Tie-2 in TM compared to SM (Figure 3D). Likewise the histological analysis revealed no changes in the presence of macrophages (Figure 4A) or the inflammatory infiltrate in lung parenchyma (Figure 4B). These data suggest that aerobic exercise in PAH rats may have a beneficial role in angiogenesis, and that this advantage is related to the initial signalling triggered by H₂O₂/VEGF/p-Akt. Additionally, Ang-1/Tie-2 signalling and the absence of a clear inflammatory process in TM animals strengthen the idea that these animals experienced physiological angiogenesis signalling, which may be involved in the development of collateral routes for pulmonary blood flow.

Aerobic exercise improves right ventricular function

In response to the increase in afterload imposed on the RV in this PAH experimental model, there was an increase in wall stress, RV hypertrophy and right heart failure. ⁽³⁵⁾⁽¹⁾ Previous studies by our group clearly demonstrated that monocrotaline increases RV mass, positively influencing right ventricular hypertrophy. Aerobic exercise was not able to mitigate this outcome 21 days after injection of monocrotaline. ⁽¹²⁾ However, aerobic exercise decreased the extracellular matrix volume in RV, stimulated an increase in intramyocardial

vessel volume and reduced end-diastolic pressure in RV. ⁽¹²⁾⁽¹¹⁾ Handoko et al. demonstrated that aerobic exercise exerted positive effects on cardiac function (cardiac output, stroke volume and TAPSE) only in a stable PAH model (40 mg/kg monocrotaline). There was no improvement in functional parameters in animals that received 60 mg/kg of monocrotaline, as evaluated by echocardiography. ⁽³⁶⁾ Due to major controversy about the effectiveness of aerobic exercise on the different pulmonary and cardiac parameters in PAH, and also the lack of studies in this area, the scientific community is now trying to determine how aerobic exercise impacts on cardiorespiratory function in rats with PAH.

In our study, it became apparent that aerobic exercise promoted a functional improvement in RV after the echocardiographic evaluation. Despite not showing changes in right ventricular hypertrophy ratios (Table 1), heart function appeared to be preserved in TM animals. Twenty-one days after monocrotaline injection (60 mg/kg), the TM animals maintained cardiac output (CO), stroke volume (SV) and TAPSE (Table 1) in comparison to the control groups (SC and TC). In addition, the TM group showed an increase in fractional area change (FAC) (Figure 6B) and a rise in fractional shortening (FS)(Figure 6C), when compared to SM animals. It is suggested that this improvement was influenced by the direct effects of aerobic exercise on cardiac function (some of these effects are mentioned in the previous paragraph). In addition, in this study, the improvement in cardiac function was associated with an increase in H₂O₂/VEGF/p-Akt angiogenic-dependent signalling.

Conclusion

In summary, this study showed that aerobic exercise promotes a significant increase in H₂O₂/VEGF/p-Akt signal for pulmonary physiological angiogenesis. This increase is associated with an improvement in RV function, as evaluated by echocardiography. Thus, it is suggested that one possible mediator for improving the RV function promoted by aerobic exercise may be the formation of new vessels, thereby reducing collateral pulmonary vascular resistance to blood flow.

FIGURES

Figure 1

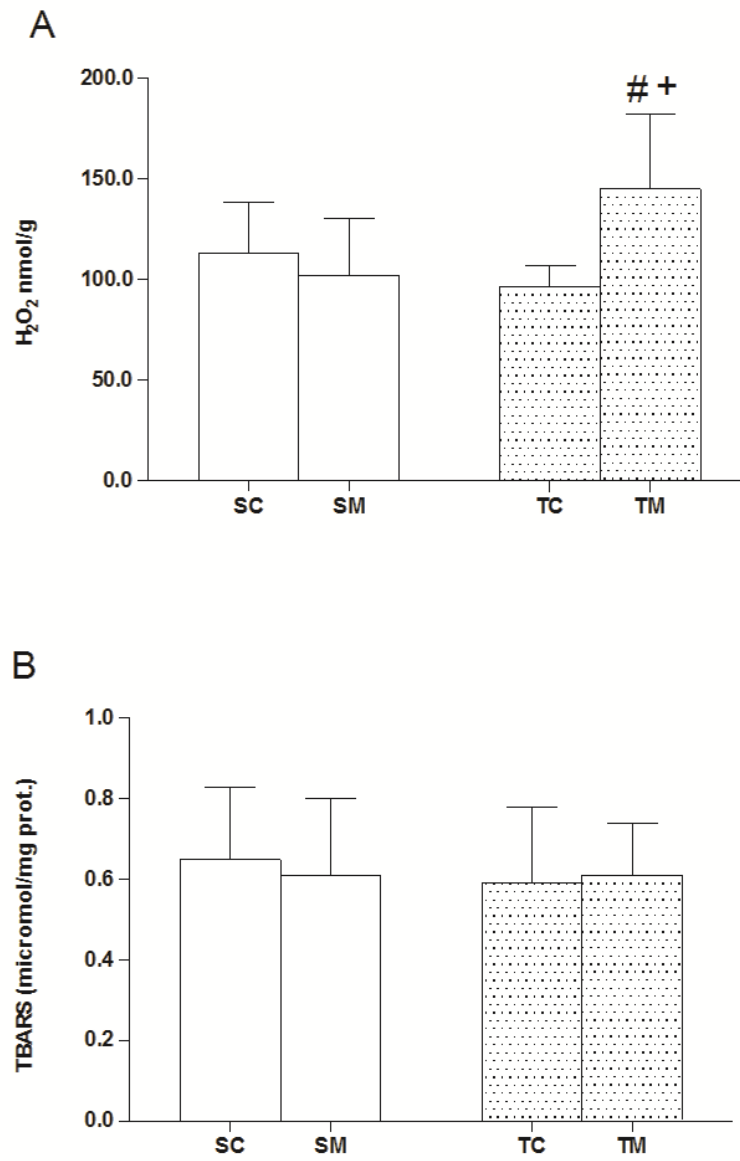


Figure 2

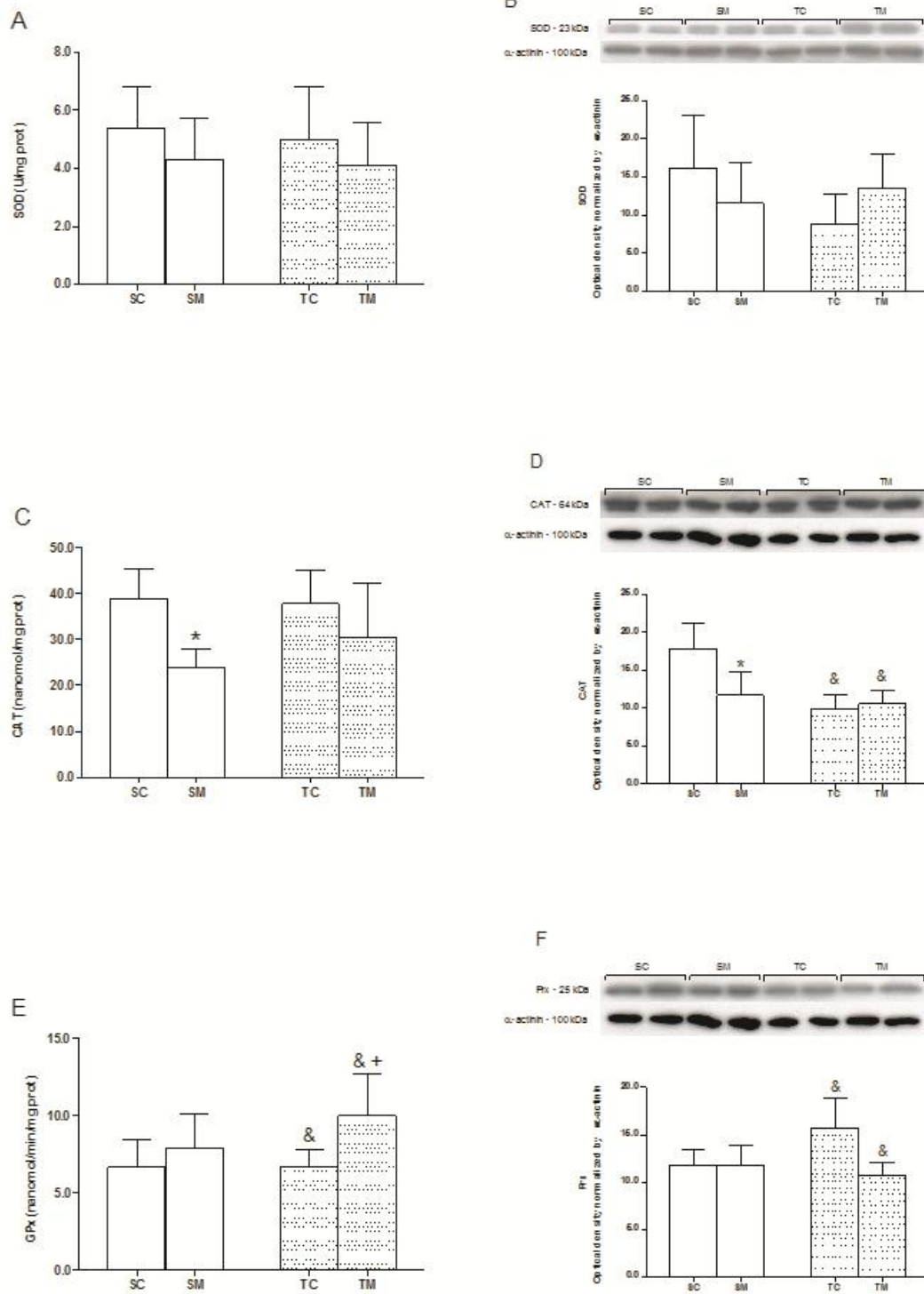


Figure 3

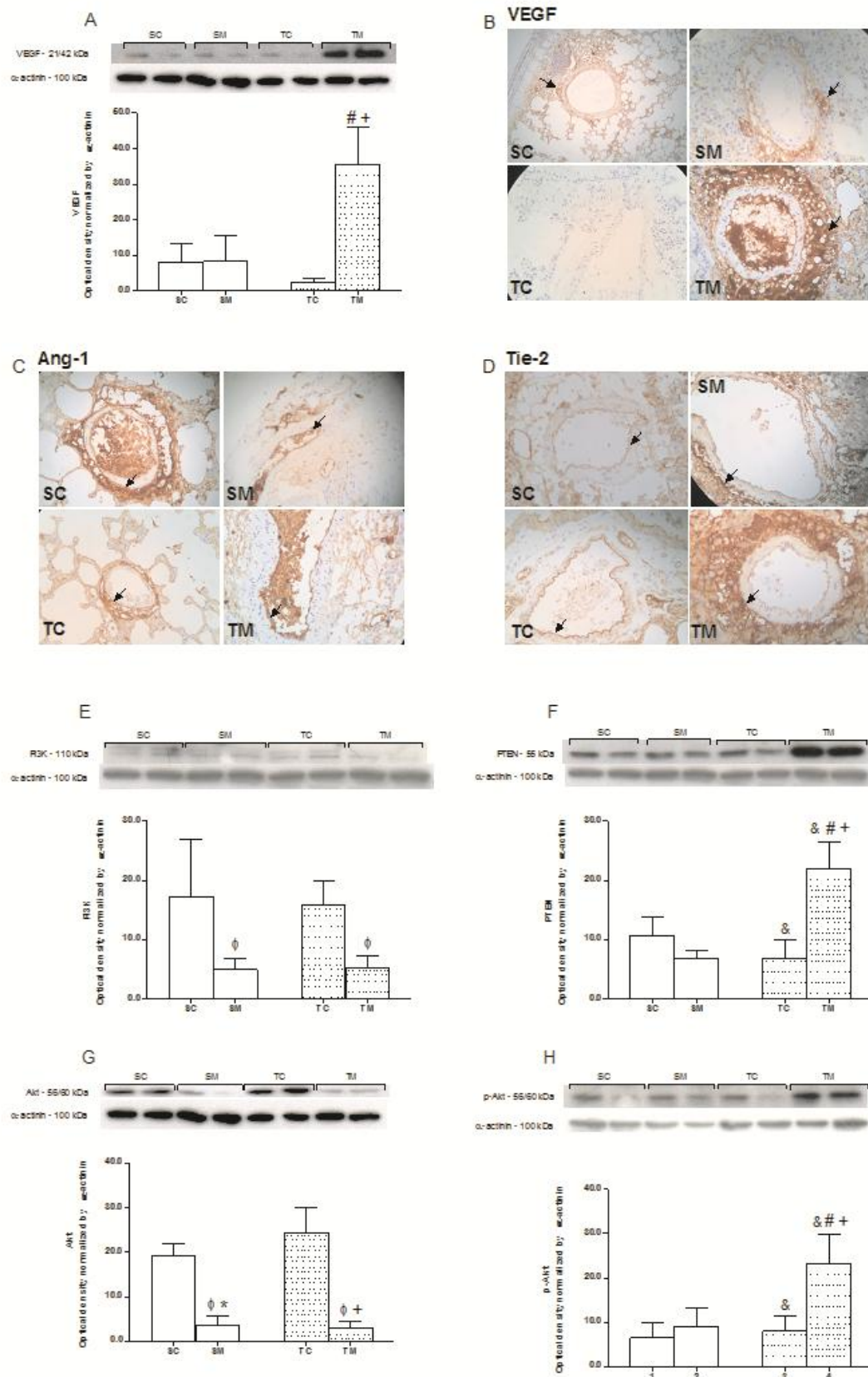


Figure 4

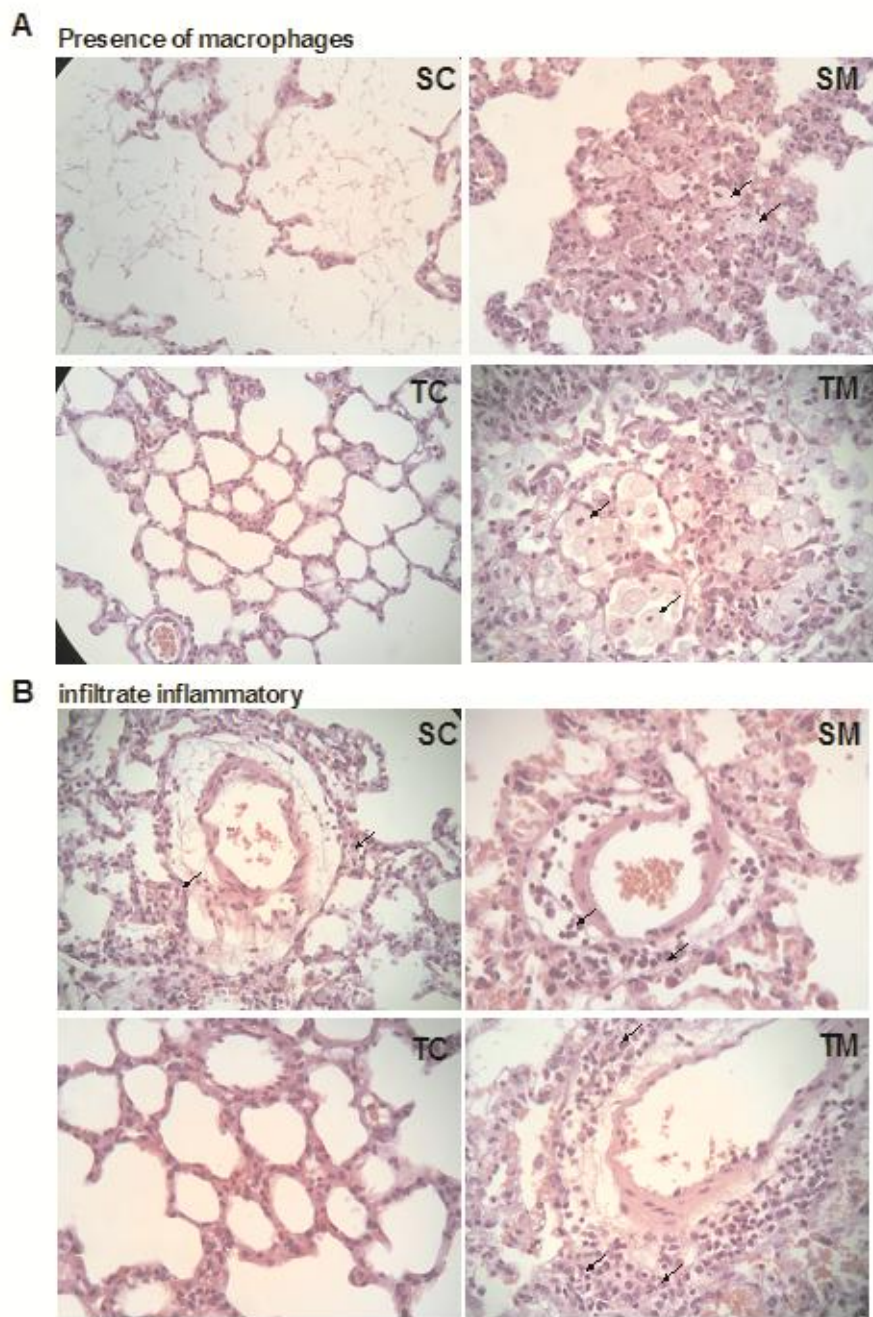
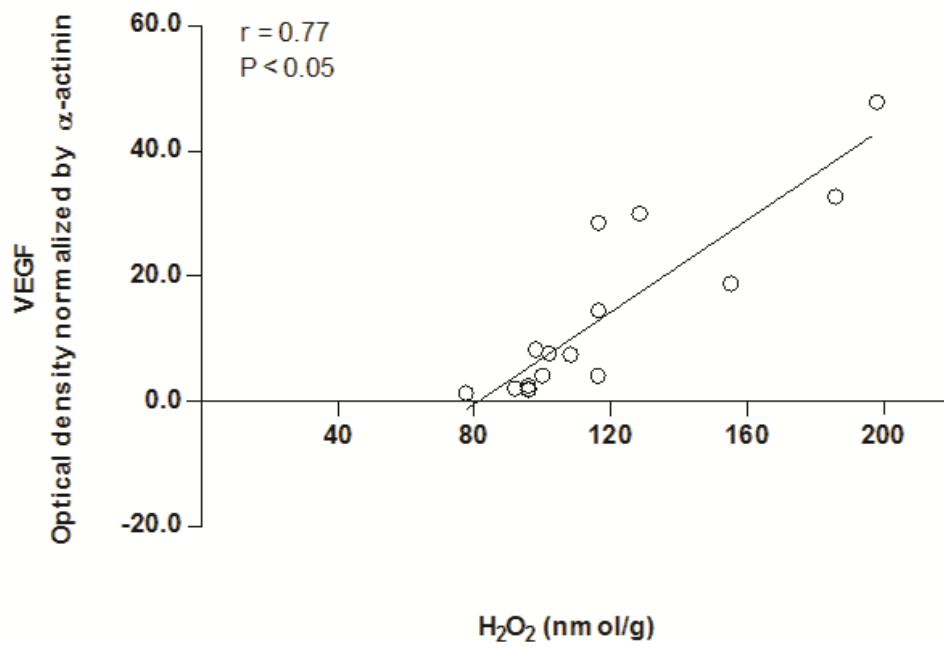


Figure 5

A



B

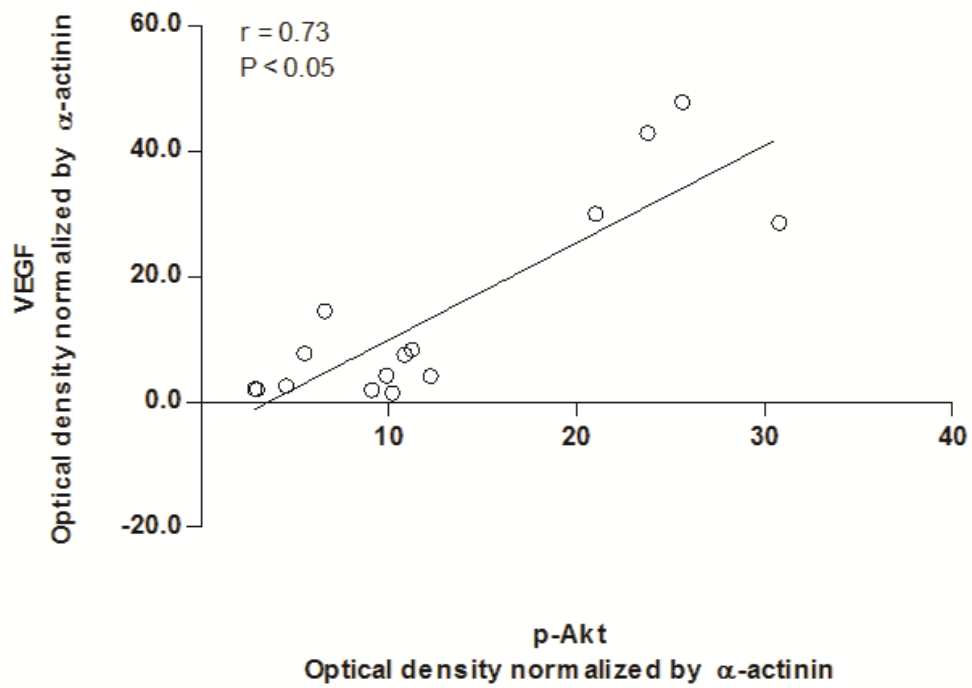
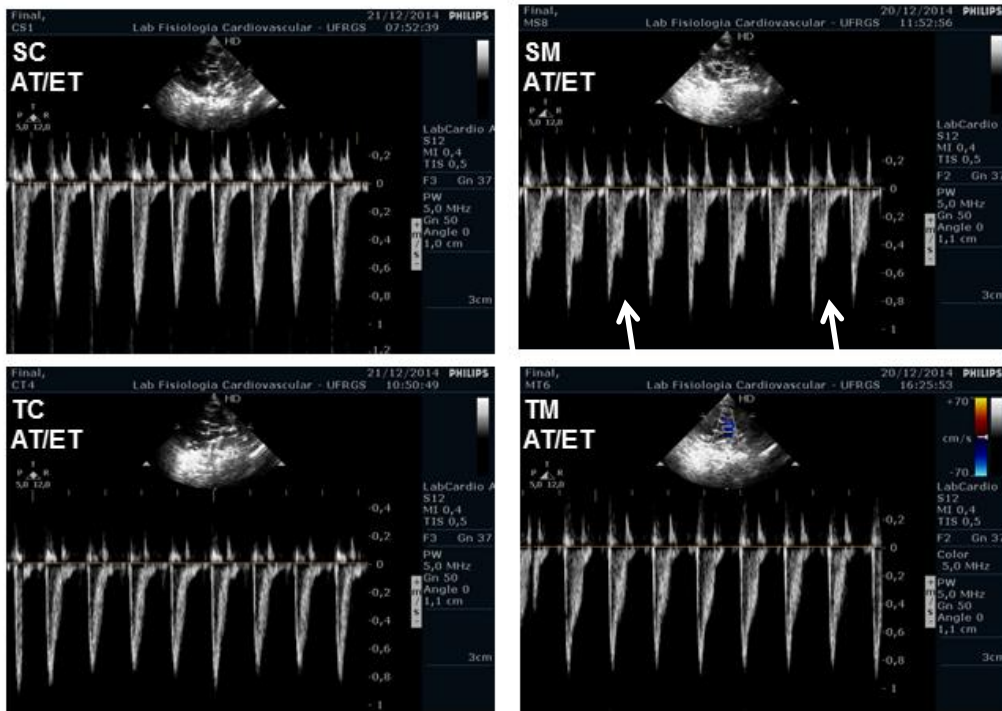
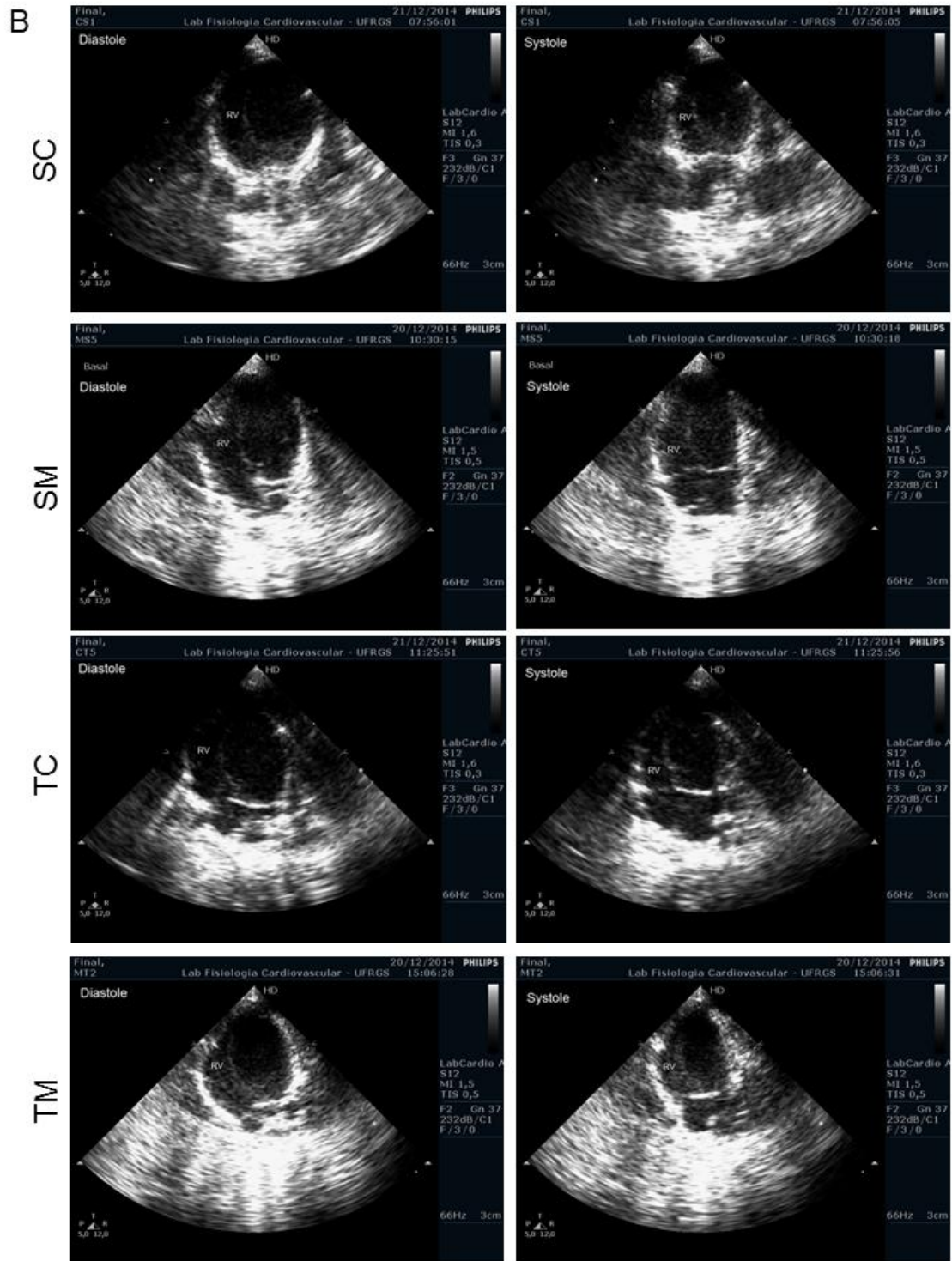


Figure 6

A





C

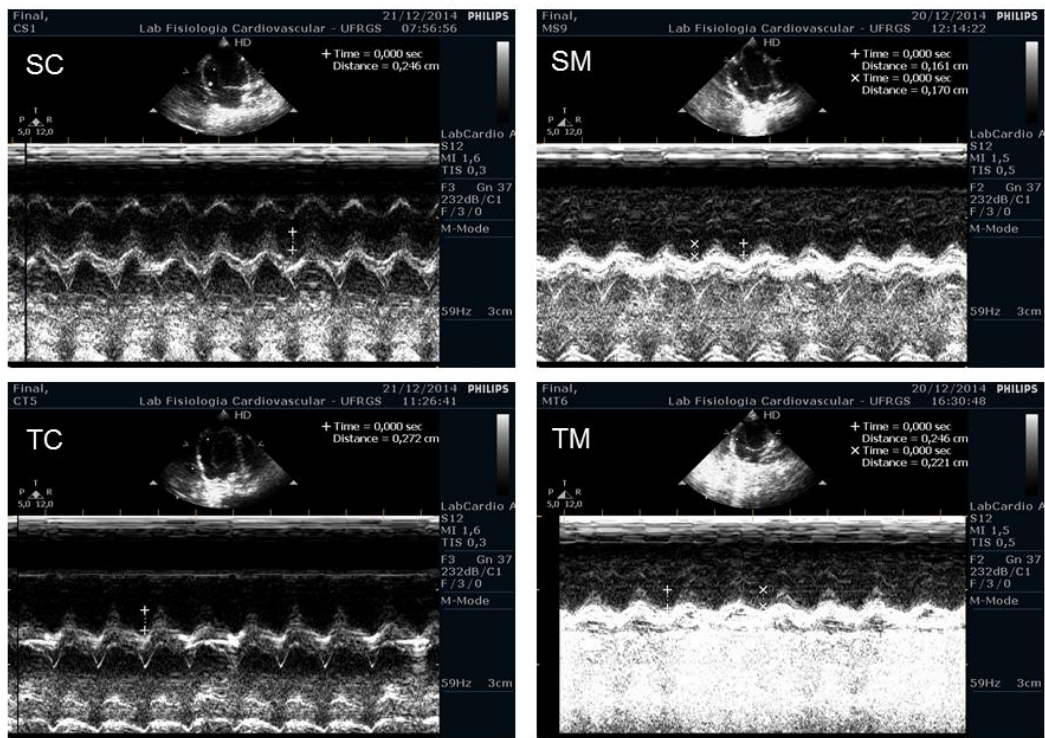


Figure Captions

Figure 1A. Hydrogen peroxide concentrations in the lung parenchyma. Values are expressed as mean \pm SD (n=7–9). ^{*}P < 0.05 compared to TC and [#]P < 0.05 compared to SM. **Figure 1B. Thiobarbituric acid reactive substances in lung parenchyma.** Values are expressed as mean \pm SD (n=7–9) SC = sedentary control; SM = sedentary monocrotaline; TC = trained control; TM = trained monocrotaline.

Figure 2A. Superoxide dismutase activity in lung parenchyma. Values are expressed as mean \pm SD (n=7-9). **2B. Superoxide dismutase immunocontent in lung parenchyma.** Values are expressed as mean \pm SD (n=4). **Figure 2C. Catalase activity in lung parenchyma.** Values are expressed as mean \pm SD (n=7-9). ^{*}P < 0.05 compared to SC. **2D. Catalase immunocontent in lung parenchyma.** Values are expressed as mean \pm SD (n=4). ^{*}P < 0.05 compared to SC and [&]P < 0.05 trained compared to sedentary. **Figure 2E. GPx activity in lung parenchyma.** Values are expressed as mean \pm SD (n=7-9). ^{*}P < 0.05 compared to TC and [&]P < 0.05 trained compared to sedentary. **2F. Prx immunocontent in lung parenchyma.** Values are expressed as mean \pm SD (n=4). [&]P < 0.05 trained compared to sedentary. SC = sedentary control; SM = sedentary monocrotaline; TC = trained control; TM = trained monocrotaline.

Figure 3A. VEGF immunocontent in lung parenchyma. Values are expressed as mean \pm SD (n=4). [#]P < 0.05 compared to SM and ^{*}P < 0.05 compared to TC. **Figure 3B.** Localization of VEGF in rat lung sections by immunohistochemical staining. Arrows indicate the areas of positive staining (x400). **Figure 3C.** Localization of Ang-1 in rat lung sections by immunohistochemical staining. Arrows indicate the areas of positive staining (x400). **Figure 3D.** Localization of Tie-2 in rat lung sections by immunohistochemical staining. Arrows indicate the areas of positive staining (x400). **Figure 3E. PI3K immunocontent in lung parenchyma.** Values are expressed as mean \pm SD (n=4). ^oP < 0.05 monocrotaline compared to saline. **Figure 3F. PTEN immunocontent in lung parenchyma.** Values are expressed as mean \pm SD (n=4). ^oP < 0.05 monocrotaline compared to saline. [#]P < 0.05 compared to SM and ^{*}P < 0.05 compared to TC. **Figure 3G. Akt immunocontent in lung parenchyma.** Values are expressed as mean \pm SD (n=4). ^oP < 0.05 monocrotaline compared to saline. **Figure 3H. p-Akt immunocontent in lung parenchyma.** Values are expressed as mean \pm SD (n=4). [&]P < 0.05 monocrotaline compared to saline. SC = sedentary control; SM = sedentary monocrotaline; TC = trained control; TM = trained monocrotaline.

Figure 4A. Representative images of macrophages presence in lung parenchyma. Arrows indicate the areas of positive staining (x400). **Figure 4B.** Representative images of inflammatory infiltrate in lung parenchyma. Arrows indicate the areas of positive staining (x400). SC = sedentary control; SM = sedentary monocrotaline; TC = trained control; TM = trained monocrotaline.

Figure 5A. The graph illustrates the correlation between H₂O₂ and VEGF immunocontent. H₂O₂ concentration correlate strongly with VEG

immunocontent; Pearson coefficient of correlation $r = 0.77$ ($P < 0.05$). **Figure 5B.** The graph illustrates the correlation between p-Akt and VEGF immunocontent. p-Akt immunocontent correlate strongly with VEGF immunocontent; Pearson coefficient of correlation $r = 0.73$ ($P < 0.05$). SC = sedentary control; SM = sedentary monocrotaline; TC = trained control; TM = trained monocrotaline.

Figure 6. Representative image of echocardiographic data. (A) acceleration time of pulmonary artery flow/ejection time of pulmonary artery flow (AT/ET); arrows indicate the presence of midsystolic knotching caused by a rise in ejection time in SM group. (B) fractional area change (FAC); systolic and diastolic right ventricle (RV) area is used to demonstrate changes in FAC of all experimental groups. (C) The tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) is marked in all experimental groups. SC = sedentary control; SM = sedentary monocrotaline; TC = trained control; TM = trained monocrotaline.

Table 1. Morphometric and echocardiographic parameters of the right ventricle

	SC	SM	TC	TM
RV/LV (g/g)	0.275 ± 0.3	0.356 ± 0.05 [*]	0.281 ± 0.01	0.352 ± 0.04 ^{Φ+}
RV/BW (g/g)	0.215 ± 0.01	0.262 ± 0.02 [*]	0.219 ± 0.004	0.259 ± 0.02 ^{Φ+}
AT/ET (sec/sec)	0.31 ± 0.08	0.23 ± 0.06	0.31 ± 0.06	0.22 ± 0.09 ^Φ
SV (mL)	0.42 ± 0.12	0.25 ± 0.11 [*]	0.34 ± 0.07	0.32 ± 0.14
CO (mL/min)	102.41 ± 31.15	61.67 ± 28.22	89.92 ± 20.99	83.29 ± 36.09
FAC	61.97 ± 4.92	29.89 ± 5.94 [*]	56.84 ± 6.06 ^{&}	50.48 ± 8.06 ^{Φ&#}
FS	36.84 ± 0.08	15.61 ± 5.82 [*]	33.38 ± 3.05	31.3 ± 8.71 [#]
TAPSE (cm)	0.21 ± 0.10	0.14 ± 0.06	0.28 ± 0.01 ^{&}	0.21 ± 0.02 ^{Φ&}
MPI	0.35 ± 0.17	0.31 ± 0.10	0.38 ± 0.12	0.24 ± 0.10
E/A (cm/s/cm/s)	0.79 ± 0.07	0.63 ± 0.12	0.91 ± 0.11 ^{&}	0.72 ± 0.06 ^{Φ&}

Table 1. Morphometric and ecocardiographic parameters of the right ventricle. Values are expressed as mean ± SD (n=7-9) in each group. ^{*}P < 0.05 compared to SC; ⁺P < 0.05 compared to TC and [#]P < 0.05 compared to SM; ^ΦP < 0.05 monocrotaline compared to saline; [&]P < 0.05 trained compared to sedentary. SC = sedentary control; SM = sedentary monocrotaline; TC = trained control; TM = trained monocrotaline.

Reference List

1. Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, Farkas D, Kraskauskas D, Voelkel NF, Bogaard HJ. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *AJP Lung Cell Mol Physiol* 2012;302:L363–L369.
2. Yu JC, Jae YH, Sang GL, Byeong TJ, Wan SC, Young SH, Gu SR, Jong DL. Temporal changes of angiotensins and Tie2 expression in rat lungs after monocrotaline-induced pulmonary hypertension *Comp Med*. 2009;59:350–356.
3. Fagiani E, Christofori G. Angiotensins in angiogenesis. *Cancer Lett* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2013;328:18–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.08.018>

4. Zhou Y, Yan H, Guo M, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Reactive Oxygen Species in Vascular Formation and Development. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013.
5. Maulik N. Redox signaling of angiogenesis. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2002 [cited 2015 Mar 4];4:805–815. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12470509>
6. Roy S, Khanna S, Sen CK. Redox regulation of the VEGF signaling path and tissue vascularization: Hydrogen peroxide, the common link between physical exercise and cutaneous wound healing. *Free Radic Biol Med* 2008;44:180–192.
7. Burgoyne JR, Oka S, Ale-Agha N, Eaton P. Hydrogen peroxide sensing and signaling by protein kinases in the cardiovascular system. *Antioxid Redox Signal*.2012;18:1042-52.
8. Forman HJ, Maiorino M, Ursini F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* 2010;49:835–842.
9. Shimizu S, Nomoto M, Yamamoto T, Momose K. Reduction by NG-nitro-L-arginine of H₂O₂-induced endothelial cell injury. *Br J Pharmacol* [Internet]. 1994 [cited 2015 Mar 31];113:564–568. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1510094&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
10. Shimizu S, Saitoh Y, Yamamoto T, Momose K. Stimulation by hydrogen peroxide of L-arginine metabolism to L-citrulline coupled with nitric oxide synthesis in cultured endothelial cells. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* [Internet]. 1994 [cited 2015 Mar 31];84:315–329. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7938904>
11. Souza-Rabbo MP, Silva LF, Auzani JA, Picoral M, Khaper N, Bell-Klein A. Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* [Internet]. 2008 [cited 2015 Apr 5];35:944–948. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18430062>
12. Colombo R, Siqueira R, Becker CU, Fernandes TG, Pires KM, Valença SS, Souza-Rabbo MP, Araujo AS, Belló-Klein A. Effects of exercise on monocrotaline-induced changes in right heart function and pulmonary artery remodeling in rats. *Can J Physiol Pharmacol* [Internet]. 2013 [cited 2015 Apr 2];91:38–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23368696>
13. Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc Immunol Rev*

- [Internet]. 2010 [cited 2015 Feb 11];16:105–118. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20839495>
14. Lambert CP, Wright NR, Finck BN, Villareal DT. Exercise but not diet-induced weight loss decreases skeletal muscle inflammatory gene expression in frail obese elderly persons. *J Appl Physiol* [Internet]. 2008 [cited 2015 Apr 2];105:473–478. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2519937&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 15. Farahmand F, Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 2004 [cited 2015 Apr 5];260:21–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15228082>
 16. Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren M V, Irigoyen M-C, Angelis K De. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2007 [cited 2015 Apr 5];6:38. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2222609&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 17. Rudski LG, Lai WW, Afilalo J, Hua L, Handschumacher MD, Chandrasekaran K, Solomon SD, Louie EK, Schiller NB. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the Canadian Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* [Internet]. 2010 [cited 2014 Jul 9];23:685–713; quiz 786–788. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20620859>
 18. Urboniene D, Haber I, Fang Y-H, Thenappan T, Archer SL. Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension. *AJP Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2010 [cited 2015 Apr 5];299:L401–L412. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2951068&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 19. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* [Internet]. 1980 [cited 2015 Apr 5];38:161–170. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6778929>
 20. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* [Internet]. 1979 [cited 2015 Jan 3];95:351–358. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269779907383>

21. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* [Internet]. 1974 [cited 2015 Feb 27];47:469–474. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4215654>
22. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* [Internet]. 1984 [cited 2015 Feb 9];105:121–126. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727660>
23. Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* [Internet]. 1984 [cited 2015 Mar 22];105:114–121. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727659>
24. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* [Internet]. 1970 [cited 2014 Jul 10];227:680–685. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>
25. Araujo ASR, Ribeiro MFM, Enzweiler A, Schenkel P, Fernandes TRG, Partata WA, Irigoyen MC, Llesuy S, Belló-Klein A. Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2006 [cited 2015 Apr 5];249:133–139. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16574313>
26. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* [Internet]. 1951 [cited 2014 Jul 16];193:265–275. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>
27. Stocker R, Keaney JF. New insights on oxidative stress in the artery wall. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2005 [cited 2015 Apr 11];3:1825–1834. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102049>
28. Miller TW, Isenberg JS, Roberts DD. Molecular regulation of tumor angiogenesis and perfusion via redox signaling. *Chem Rev* [Internet]. 2009 [cited 2015 Apr 12];109:3099–3124. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2801866&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
29. Deisseroth A, Dounce AL. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev* [Internet]. 1970 [cited 2015 Apr 12];50:319–375. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4912904>
30. Kim Y-W, Byzova TV. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood* [Internet]. 2014;123:625–631. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24300855>
31. Chen L, Hou X, Xiao J, Kuroda J, Ago T, Sadoshima J. Both hydrogen peroxide and transforming growth factor beta 1 contribute to endothelial

- Nox4 mediated angiogenesis in endothelial Nox4 transgenic mouse lines. *BBA - Mol Basis Dis* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;1842:2489–2499. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.10.007>
32. Zhao K, Song X, Huang Y, Yao J, Zhou M, Li Z, You Q, Guo Q, Lu N. Wogonin inhibits LPS-induced tumor angiogenesis via suppressing PI3K/Akt/NF- κ B signaling. *Eur J Pharmacol* 2014;737:57–69.
 33. Teichert-Kuliszewska K, Maisonpierre PC, Jones N, Campbell AI, Master Z, Bendeck MP, Alitalo K, Dumont DJ, Yancopoulos GD, Stewart DJ. Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2001 [cited 2015 Apr 13];49:659–670. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11166279>
 34. Daly C, Pasnikowski E, Burova E, Wong V, Aldrich TH, Griffiths J, Ioffe E, Daly TJ, Fandl JP, Papadopoulos N, McDonald DM, Thurston G, Yancopoulos GD, Rudge JS. Angiopoietin-2 functions as an autocrine protective factor in stressed endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006 [cited 2015 Mar 22];103:15491–15496. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1592534&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 35. Bogaard HJ, Abe K, Noordegraaf AV, Voelkel NF. The right ventricle under pressure. *Chest* 2009;135:794–804.
 36. Handoko ML, Man FS De, Happé CM, Schaliij I, Musters RJP, Westerhof N, Postmus PE, Paulus WJ, Laarse WJ Van Der, Vonk-Noordegraaf A. Opposite effects of training in rats with stable and progressive pulmonary hypertension. *Circulation* 2009;120:42–49.

5.3 Resultados artigo II

Status do artigo: Artigo aceito

Revista científica: Journal of Cardiovascular Pharmacology

Fator de impacto: 2,111

Objetivo: Avaliar a influência do exercício aeróbio sobre o sinal apoptótico dependente do H₂O₂ no ventrículo direito de ratos com *Cor pulmonale*.

Título: AEROBIC EXERCISE PROMOTES A DECREASE IN RIGHT VENTRICLE APOPTOTIC PROTEINS IN EXPERIMENTAL COR PULMONALE

Rafael Colombo¹; Rafaela Siqueira¹; Adriana Conzatti¹, Tânia Regina Gattelli Fernandes¹, Angela Maria Vicente Tavares¹, Alex Sander da Rosa Araújo¹, Adriane Belló-Klein¹.

Affiliations

¹ Laboratory of Cardiovascular Physiology and Reactive Oxygen Species – Federal University of Rio Grande do Sul.

Running title: Exercise and apoptotic signalling in *Cor pulmonale*.

Key words: monocrortaline, hydrogen peroxide, endurance training, pulmonary arterial hypertension, cardiac hypertrophy.

Corresponding Author: Dr. Adriane Belló-Klein

Work Telephone Numbers: +55 51-33083621

Email Addresses:

Rafael Colombo: ralombo@hotmail.com

Rafaela Siqueira: rafaela_siqueira@yahoo.com.br

Adriana Conzatti: driconzatti@gmail.com

Tânia Regina Gattelli Fernandes: taniaufrgs@yahoo.com.br

Angela Maria Vicente Tavares: angelamvtavares@gmail.com

Alex Sander da Rosa Araújo: alsanderaraujo@hotmail.com

Adriane Belló-Klein: belklein@ufrgs.br

Abstract

Pulmonary arterial hypertension is characterized by progressive increases in resistance and pressure in the pulmonary artery and *Cor pulmonale*. The effect of exercise on hydrogen peroxide-dependent signalling in the right ventricle (RV) of *Cor pulmonale* rats was analysed. Rats were divided into a sedentary control (SC), sedentary monocrotaline (SM), trained control (TC) and trained monocrotaline (TM) groups. Rats underwent exercise training (60% of VO_2 max.) for five weeks, with three weeks post MCT injection (60 mg/kg i.p.). Pulmonary resistance was enhanced in SM (2.0 fold) compared to SC. Pulmonary artery pressure was increased in SM (2.7 fold) and TM (2.6 fold) compared to their respective controls (SC and TC). RV hypertrophy indexes increased in SM compared to SC. Hydrogen peroxide was higher in SM (1.7 fold) than SC, and was reduced by 47% in TM compared to SM. p-Akt was increased in TM (2.98 fold) compared to SM. The Bax/Bcl-2 ratio and caspase 3 were also increased (2.9 fold and 3.9 fold, respectively) in SM compared to SC.

Caspase 3 was decreased in TM compared to SM ($P < 0.05$). Therefore, exercise training promoted a beneficial response, by decreasing hydrogen peroxide concentrations, and consequently, apoptotic signaling in RV.

Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a severe disease characterized by progressive increases in resistance and pressure in the pulmonary artery due to pulmonary arteriole remodelling.¹ Pulmonary vascular obstruction usually progresses and imposes an overload on the right ventricle (RV), and may lead to a worsening of right ventricular function known as *Cor pulmonale*. The disease outcome is predominantly determined by the hypertrophic response of the RV to increased afterload.² An epidemiological study showed that 20–50 persons per million suffer from PAH and the survival rate in those individuals is 3.8 and 5.6 years in females and males, respectively.³ Untreated PAH patients have 1, 3, and 5 year survival rates of 68%, 48%, and 34%, respectively.⁴

Oxidative stress is closely related to the functional decline and adverse remodelling of the heart observed in *Cor pulmonale* induced by monocrotaline.⁵ Increasing evidence suggests that reactive oxygen species (ROS) also serve as second messengers, mediating both physiological and pathological responses.⁶ It is known that a very large increase in the levels of ROS can deregulate basic cellular functions and cause adverse cardiac remodelling, influenced by pro-apoptotic signalling. Mitochondria can also participate in redox signalling, being the main cellular organelles for H_2O_2 formation.⁷ In situations of oxidative stress, thiol oxidation can become an irreversible event, modifying protein structure and apoptotic signalling in cardiomyocytes. The classical signal transduction of

stimulatory G protein (caused by endothelin 1, mechanical overload, angiotensin II and adrenergic stimulation) leads to cardiomyocyte apoptosis, facilitating the opening of membrane mitochondrial transition pores by Bax (Bcl-2-associated X protein) activation and the development of a pathological hypertrophic phenotype.⁸ Moreover, cellular stress induced by ROS can initiate the activation of mitochondrial proteins that will interact with domains of the Bax and Bcl-2 proteins. This interaction may open transition pores in the outer mitochondrial membrane, facilitating the relocation of cytochrome c that is released by mitochondria. The release of cytochrome c is crucial to the formation of apoptosomes and activation of pro-caspase 3, a protein directly involved in cellular apoptosis.⁹ In a study published in 2010 utilizing umbilical vein endothelial cells, it was noticed that expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 was decreased by hydrogen peroxide, whereas the expression of Bax (pro-apoptotic) was increased.¹⁰ Likewise, the use of an antioxidant was able to activate a protein involved in cell survival and physiologic hypertrophy induced by exercise (protein kinase B - Akt) and inactivate signalling for Bax-dependent apoptosis.¹⁰

On the other hand, it is known that, at low concentrations, the formation of ROS is important for an adaptive response that can improve cytoprotection, a phenomenon termed hormesis.¹¹ Exercise is a good example of a hermetic effect induced by ROS. It is believed that this response is related to an increase in antioxidant protein expression induced by exercise training.¹² Furthermore, a small and transient increase in ROS caused by exercise can trigger a beneficial adaptive response, which is characterized by a positive effect on cardiac remodelling and function, and activate cAMP-dependent protein kinase and

Akt.¹³ According to the literature, there are two independent pathways for exercise activation of Akt. The first is the classical pathway dependent on insulin-like growth factor (IGF-1/PI3K/Akt). The other path is by increasing the activity of cAMP-dependent protein kinase, also called protein kinase A (PKA).¹⁴⁻¹⁶ Thus, different levels of protein oxidation induced by ROS may mediate adaptive or maladaptive cardiac remodelling and could affect the progression of *Cor pulmonale*.^{17,18}

There is a paucity of information on the possible effects induced by exercise training on redox-sensitive signalling and its relation to remodelling of RV in *Cor pulmonale*. Due to the major controversy in the scientific literature about the effects of physical exercise on the treatment of *Cor pulmonale*, the search for information that may answer these questions has proven to be crucial. Thus, this work has as its main objectives to evaluate the role of aerobic exercise on pulmonary vascular resistance and on the expression of proteins involved in the balance of cell survival and apoptosis influenced by ROS.

Methods

Ethical Approval

All procedures used in this study were in accordance with the Ethical Principles for Animal Experimentation formulated by the National Council of Control and Animal Experimentation and in agreement with the ethics in research committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (approval number 21398).

Experimental Design

Male Wistar rats weighing 146 ± 16 g were used. Animals from the Federal University of Rio Grande do Sul Animal Care received water and food *ad libitum* and were housed in a temperature (20–25°C) and humidity (70%) controlled environment with a regulated light/dark cycle of 12 h. The total number of rats used was 30 animals. The sample size for each experiment (n) is cited in the description of each outcome. Animals were divided into four groups: 1) sedentary control (SC), animals that did not receive monocrotaline and were not involved in the aerobic exercise protocol; 2) trained control (TC), animals that did not receive monocrotaline but participated in the aerobic exercise protocol; 3) sedentary monocrotaline (SM), animals that received monocrotaline and were not involved in the aerobic exercise protocol and 4) trained monocrotaline (TM), animals that received monocrotaline and participated in the aerobic exercise protocol.

Animals in the TC and TM groups were subjected to an aerobic exercise protocol that consisted of five weekly sessions held for five weeks.¹⁹ Two weeks of training were established on a treadmill (Imbramed TK-01, Porto Alegre, Brazil) adapted for rodents. This period was started with 15 min at 0.6 km/h and finished with a session of 60 min at 0.9 km/h.²⁰ At the end of the second week of training, all animals were anesthetized with ketamine and xylazine (90 mg/kg i.p./10 mg/kg i.p.) and assessed by basal echocardiography. After echocardiographic analysis, the monocrotaline groups (SM and TM) received a single injection of monocrotaline (MCT) (60 mg/kg i.p.) or the same volume of saline (SC and TC groups)⁵. On the day after injection, the animals underwent the maximum speed test, established according to Rodrigues et al, in order to

readjust the workload imposed (60% of maximal oxygen consumption).²¹ Twenty-four hours after the test, the animals started three weeks of exercise training. At the end of the second week of training, the maximum speed test was repeated and, at the end of the third week, the animals were anesthetized with ketamine (90 mg/kg) and xilazine (10 mg/kg), final echocardiography was performed and the rats were sacrificed by cervical dislocation even under the effects of anesthesia.

Echocardiographic Assessment

For echocardiographic analysis the EnVisor Philips (Andover, MA) system with a 12-to 13-MHz transducer was used, for 3 cm deep, fundamental and harmonic images. Pulmonary vascular resistance (PVR) was measured by the acceleration time/ejection time (AT/ET) ratio of pulmonary artery flow.²²

Haemodynamic Measurements

For the haemodynamic recordings the animals were anesthetized with ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) administered intraperitoneally. Each animal's jugular vein was exposed and a polyethylene catheter (PE-50) filled with saline was introduced into the right atrium and ventricle. The right ventricular systolic pressure (RVSP) was monitored using a pressure transducer (Strain-Gauge - Narco Biosystem Miniature Pulse Transducer PR-155, Houston, TX - USA) connected to a signal amplifier (HP 8805C Pressure Amplifier).²⁰ The analogue pressure data were digitized (Windaq, Data Acquisition System, PC, Akron, OH - USA) over a frequency range of 1,000 Hz and expressed in mmHg. To estimate the pulmonary artery pressure (PAP), the following formula was used: mean PAP (in mmHg) = 0.61 x systolic PAP+2. The

right ventricular systolic pressure (RVSP) was used in order to estimate systolic pulmonary artery pressure. It is well known that RVSP is similar to the systolic pulmonary artery pressure, justifying their use in the formula described above.²³

Morphometric Analysis

After final echocardiography, the animals, still anesthetized, were sacrificed. The heart was quickly removed and RV hypertrophy was assessed by the relationship between RV mass/body mass (mg/g), RV mass/tibia length (mg/mm), or right ventricular mass/left ventricular mass (mg/mg). Hearts were immediately frozen in liquid nitrogen and homogenized to perform molecular and biochemical evaluations.

Cardiac Concentration of Hydrogen Peroxide

The assay was based on horseradish peroxidase-mediated oxidation of phenol red by hydrogen peroxide. The right ventricular samples were homogenized in potassium chloride (1.15% w/v) and phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF 20 mmol/L), and centrifuged (1,000 x g for 20 min at 0° to 4°C). The supernatants were used for further analysis. A standard curve of hydrogen peroxide concentrations of 10, 20 and 30 (µmol/L) was also constructed. After adding hydrogen peroxide to the standard curve and the supernatants of the homogenates to microplate wells, the experiment was continued with phenol red dextrose buffer and incubation with horseradish peroxidase buffer (PRS). After adding the PRS buffer, the microplate was shaken at room temperature for 25 min. To each sample 1 mol/L of NaOH was then added, a reading was taken at 610 nm, and tissue hydrogen peroxide concentration was expressed as pmol/mg of tissue.²⁴

Western Blot Analysis

The right ventricle was homogenized in a homogenizer (Ultra-Turrax, Bosch, Atibaia, SP, Brazil) with 10x cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) diluted in Mili-Q water and PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride) was added. The suspension was centrifuged at 8,000 x g for 15 min at 4°C to remove the nuclei and cell debris. The supernatants were then used for western blot analysis. Forty-eight µg of protein were subjected to one-dimensional SDS-PAGE in a discontinuous system using different concentrations of separating gel and stacking gel.^{25,26} The separated proteins were transferred electrophoretically to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes using a running buffer (pH 8.2, Tris 25 mmol/L, glycine 192 mmol/L and SDS 0.1%) in a cooled Bio-Rad TransBlot Unit (Bio-Rad, São Paulo, SP, Brazil). Non-specific protein binding was blocked by a 1 h incubation with non-fat milk in Tris buffer. Membranes were processed for immunodetection using the following primary antibodies: Anti-PI3K, anti-Akt 1/2/3, anti-p-Akt 1/2/3, anti-Bax, anti-Bcl2 and anti-caspase 3, all obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Binding of the primary antibodies was detected with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase, and membranes were developed using chemiluminescence detection reagents. The autoradiographs generated were analysed quantitatively with an ImageJ image densitometer (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). The molecular weights of the bands were determined by reference to a standard series of molecular weight markers (RPN 800 rainbow full range; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The optical density (o.d.)

results from each sample were normalized according to their immunocontent of β -tubulin.

Protein content was determined by the method of Lowry, using bovine serum albumin as a standard.²⁷

Statistical Analysis

All statistical tests were carried out using the Statistical Package for the Social Sciences 17.0 software (SPSS 17.0). The sample size (n) was calculated a priori from data obtained from the literature, considering $\alpha = 0.05$ and a statistical power of 80% ($\alpha = 0.8$). The value of n obtained for each analysis is indicated in individual figures and tables. Results are presented as means \pm SD. Comparisons among parametric data were performed by two-way analysis of variance, with complementary post-hoc *Bonferroni* test. Differences were considered statistically significant when the alpha error probability was less than 0.05 ($P < 0.05$).

Results

Echocardiographic Parameters

Acceleration Time/Ejection Time (AT/ET ratio)

A significant decrease (50%) was noted in the AT/ET ratio in animals receiving monocrotaline (SM) as compared to control animals (SC) (0.26 ± 0.06 and 0.13 ± 0.02 , respectively). The decrease in this ratio shows that there was a significant increase in pulmonary vascular resistance in SM animals. In contrast, the animals that received monocrotaline and participated in the aerobic exercise protocol (TM) did not show statistically significant changes in AT/ET ratio, which

implies that the exercise may minimize the insults induced by increase in pulmonary vascular resistance in the TM group (Fig. 1A).

Pulmonary Artery Pressure (PAP)

The PAP was elevated in monocrotaline animals. A significant increase (2.7 fold) in SM compared to SC was noted. Comparing TM animals to TC, a rise (2.6 fold) in this outcome was apparent. The PAP was not affected by aerobic training (Fig. 2).

Morphometric Parameters

Hypertrophy Indexes

In sedentary monocrotaline animals (SM) a significant increase in RV hypertrophy indexes was identified when compared to the sedentary control group (SC), a predominant characteristic of this drug-induced *Cor pulmonale*. In contrast, in trained monocrotaline animals (TM), no increase in hypertrophy ratios was noted when compared to the TC group. In SM animals, this increase was 63% relative to their respective control (SC), while for TM, the increase was 29% compared to its control (TC). No changes between the SM and TM groups were noted (Table 1).

Cardiac Concentration of Hydrogen Peroxide

Due to its stability and free flow through membranes, hydrogen peroxide is the main ROS involved in intracellular signalling. In SM animals a significant increase (71%) in hydrogen peroxide concentration was noted compared to SC (0.41 ± 0.10 and 0.24 ± 0.04 , respectively). Taking the effect of aerobic exercise on *Cor pulmonale* into account, a significant decrease (47%) in this outcome

was visualised in TM animals compared to SM (0.22 ± 0.05 and 0.41 ± 0.10 , respectively) (Fig. 3).

Immunocontent of Proteins Involved in Physiologic and Pathologic Hypertrophy

In order to visualize the phenotypic characteristics of hypertrophy in each of the experimental groups, we sought to analyse intracellular proteins involved in adaptive and maladaptive remodelling in the RV.

Proteins Involved in Exercise-Induced Hypertrophy

The upstream Akt protein phosphoinositide 3-kinase (PI3K) did not show any significant changes at the end of the experimental protocol (Table 2). The Akt signalling pathway is involved in adaptive signalling of the heart against extrinsic or intrinsic stimuli. The p-Akt immunocontent had an increase (3.4 fold) in TM animals compared to SM (1.88 ± 0.56 o.d. and 0.63 ± 0.14 o.d., respectively) (Fig. 4). However, total Akt immunocontent did not change among the groups (Table 2).

Proteins Involved in Apoptotic Signalling

The susceptibility of RV to apoptosis was verified by analysing proteins involved in this response. One of the markers evaluated was the Bax/Bcl-2 ratio, which was found to be significantly increased (2.9 fold) in the SM group as compared to its respective control group (SC) (0.72 ± 0.18 o.d. and 0.25 ± 0.01 o.d., respectively). Nevertheless, when analysing this ratio in the TM group, despite detecting a minimization of this outcome caused by exercise training, significant changes were not visualised when compared to SM (Fig. 5).

Caspase 3, which plays a central role in the execution phase of apoptosis, had its immunoccontent significantly increased (3.4 fold) in animals of the SM group as compared to the SC group (3.79 ± 0.73 o.d. and 0.95 ± 0.25 o.d., respectively). Analysing the effect of training in the monocrotaline groups (SM and TM), there was a significant attenuation (48%) in the signal for this protein after exercise training (3.79 ± 0.79 and 1.97 ± 0.58 , respectively). Participation by animals receiving monocrotaline in the exercise program was able to promote a decrease in the immunoccontent of caspase 3, equating this measurement to baseline (Table 2).

Discussion

The main finding of our study was that aerobic exercise can decrease intracellular signalling for apoptosis in an severe experimental model of *Cor pulmonale*, and that the decrease in this signal is associated with the antiapoptotic role of Akt.

Effects of Exercise on Right Ventricle Remodeling

In a previous study from our group, it was observed that aerobic exercise was not able to minimize cardiac hypertrophy induced by monocrotaline. However, a reduction in the extracellular matrix and an increase in intramyocardial vessel volume were noted.¹⁹ Handoko *et al.* demonstrated that exercise was able to increase cardiac capillarization by 25%, which may be associated with an improvement in tissue perfusion and restoration of cardiac function after pressure overload.²⁸ In the present study, pathologic hypertrophy observed in SM rats was generated due to the increased afterload imposed by pulmonary artery pressure elevation, a common outcome of *Cor pulmonale*. In

fact, our results showed that monocrotaline decreased the AT/ET ratio, suggesting an increased pulmonary vascular resistance. This result is reinforced by the data on mean pulmonary pressure observed in this study. However, in animals receiving monocrotaline and undergoing physical exercise, pulmonary vascular resistance was not significantly different from its control. The percentage change in RV hypertrophy in TM animals compared to TC was increased (29%), which was not statistically significant, while it was significantly greater (63%) in SM animals when compared to SC. The AT/ET ratio showed the same pattern of response. Thus, it can be suggested that exercise minimizes pulmonary vascular resistance and consequently RV hypertrophy generated by the increase in afterload imposed by monocrotaline in this severe model of *Cor pulmonale*.

Apoptotic Protein Immunocontent on Right Ventricle

It is well known that apoptosis is an event associated with various features of cardiac pathology. Apoptosis is observed in pressure overload or ischemia and is linked to progression to heart failure.²⁹ In cardiac hypertrophy and heart failure an increase in Bax expression is noted, which promotes the formation of mitochondrial pores, releasing cytochrome c. Cytochrome c release acts to activate caspase-dependent apoptosis, a phenomenon that is directly linked to a decrease in cardiac contractility.³⁰ In our experimental model, it was noted that Bax and caspase 3-dependent signalling were increased in animals receiving monocrotaline compared to control animals. This suggests that our model of right heart failure follows the same molecular profile for apoptosis as other pathological models of cardiovascular diseases.^{29,30}

Besides Bax-dependent apoptotic signalling, other proteins are also involved in anti-apoptotic events such as the Bcl-2 protein, responsible for suppressing the opening of mitochondrial membrane pores.³¹ This suppression is due to the antagonistic action of Bcl-2 over Bax.⁹ In our study, it was noted that animals receiving monocrotaline that developed *Cor pulmonale* showed increases in their Bax/Bcl-2 ratio at the end of the experimental protocol. This suggests that the apoptotic signal is strengthened in this disease.

There is clear evidence that redox status is involved in the modulation of apoptosis. This event may be mediated by hydrogen peroxide, which due to its high stability and free movement across cell membranes may act on proteins involved in apoptotic events. It is known that hydrogen peroxide can stimulate the release of mitochondrial cytochrome c. Furthermore, treatment of endothelial cells with an antioxidant known as catalpol was able to reduce hydrogen peroxide concentrations and, at the same time, reduce apoptosis and caspase 3 activity.¹⁰ Catalpol is also known to stimulate the expression of anti-apoptotic proteins such as Bcl-2.³² Thus, it was suggested that the increase in RV hydrogen peroxide concentrations of SM animals when compared to the SC group is associated with the increase in the apoptotic signal noted. Despite knowing that there is a relationship between intracellular hydrogen peroxide concentrations and strengthening of the apoptotic signal, the mechanisms involved in this relationship are still not well elucidated.

Influence of Exercise on Right Ventricle Signalling

Our data suggest that the expression of proteins involved in apoptosis and the concentration of hydrogen peroxide in the RV of *Cor pulmonale* rats are

influenced by aerobic exercise. In our experimental model, five weeks of aerobic exercise on a treadmill was able to decrease caspase-3 expression and reduce hydrogen peroxide concentrations in TM animals when compared to SM. These data suggest that exercise plays an anti-apoptotic role in this model of severe *Cor pulmonale*, which seems to be related to the decrease in ROS concentrations. Besides exercise training promoting an improvement in aerobic capacity, it is directly involved in cellular adaptations, including mitochondrial biogenesis, an improvement in the efficiency of heart mitochondrial oxidative phosphorylation, a reduction in the transition pores permeability of mitochondria and an increase in enzymatic antioxidant activity.³³ One possible mechanism by which aerobic exercise exerts cardioprotection may be its role in the expression of antioxidant enzymes and anti-apoptotic proteins in cardiac tissue, providing an improvement in cardiac resistance to apoptosis in an ischemia/reperfusion situation.³⁴ One of the key proteins involved in this adaptive remodelling is Akt. Besides being involved in cell survival signalling and improving cardiac metabolism, Akt is directly linked to inhibition of caspase-dependent apoptotic signalling.^{9,35,36} Moreover, it is already clear that exercise reduces the formation of hydrogen peroxide, possibly by acting positively on mitochondrial complex I.³⁷ It is suggested that the decrease in ROS production promoted by exercise can influence a reduction in caspase 3 expression and, therefore, mediate a decrease in mitochondrial permeability and reduce apoptotic signalling mediated by Akt in TM rats.

It is clear from the literature that activation of Akt upon physiologic hypertrophy induced by exercise training is dependent on the IGF1-PI3K pathway.³⁶ This signalling is associated with a series of intracellular responses;

among them, stimulation of protein synthesis, changes in gene expression, and improvements in tissue perfusion and energy metabolism can be noted. Following this logic, PI3K is activated upon IGF-1 binding to its tyrosine kinase receptor, causing an increase in the formation of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns (3,4,5) P₃). The formation of PtdIns (3,4,5) P₃ is the main mechanism involved in Akt activation. However, PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase) can also act together with the PtdIns (3,4,5) P₃ by stimulating Akt dependent signalling.³⁸ In addition, phosphatase and tensin homolog (PTEN) acts to dephosphorylate PtdIns (3,4,5) P₃, inhibiting Akt activation and physiologic hypertrophy signalling.^{38,39} Although statistically significant changes in the immunocontent of PI3K were not found and we did not explore all the pertinent factors, the current experimental findings essentially imply that this classical pathway may be involved in the increased Akt-dependent phosphorylation observed in TM animals.

Conclusion

In summary, our study suggests that exercise exerts a positive influence on *Cor pulmonale* progression following the monocrotaline-induced RV hypertrophy in rats. In addition to promoting a structural improvement, as described above, it is believed that this beneficial response is influenced by a decrease in the concentration of hydrogen peroxide, consequently promoting a decrease in apoptotic signalling in RV (Figure 6). Just by demonstrating that aerobic exercise promotes an improvement in the outcomes analysed, the clinical significance of this adjuvant in the treatment of severe *Cor pulmonale* should be investigated.

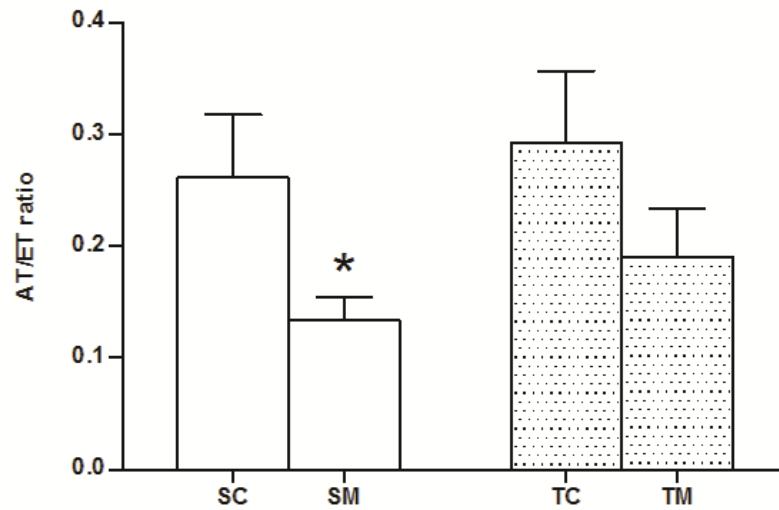
Funding

This work was supported by CNPq, CAPES and FAPERGS, Brazilian Research Agencies.

FIGURES

Figure 1

A. AT/ET ratio



B. Representative image of pulmonary artery outflow

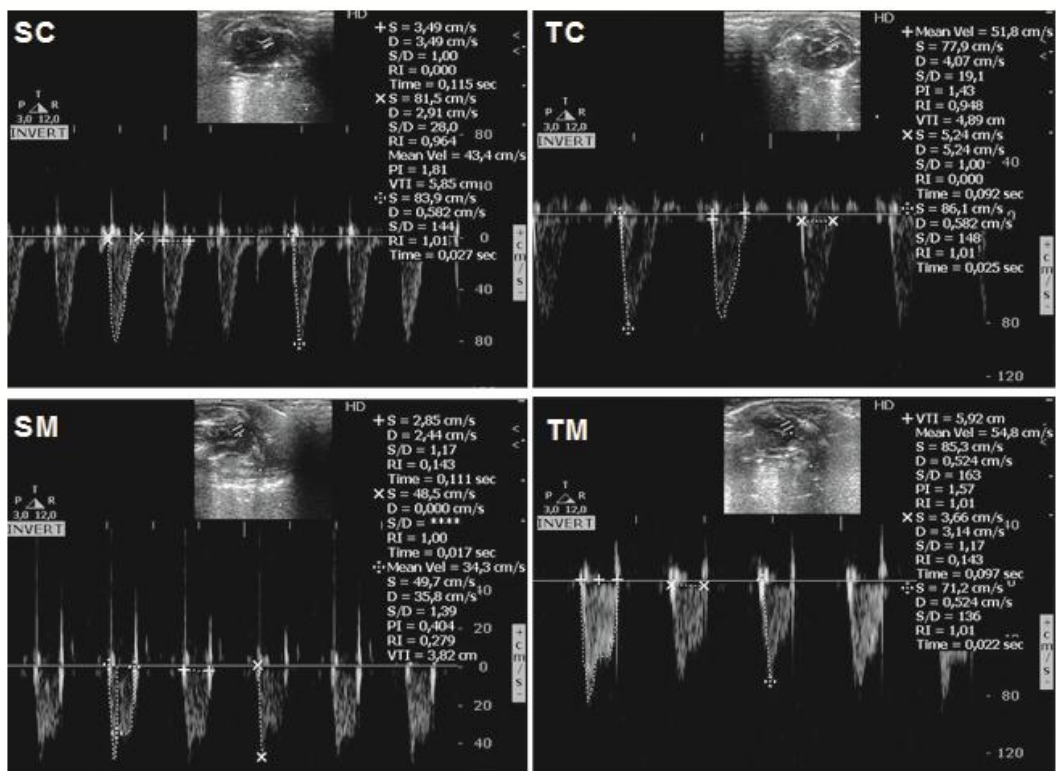


Figure 2

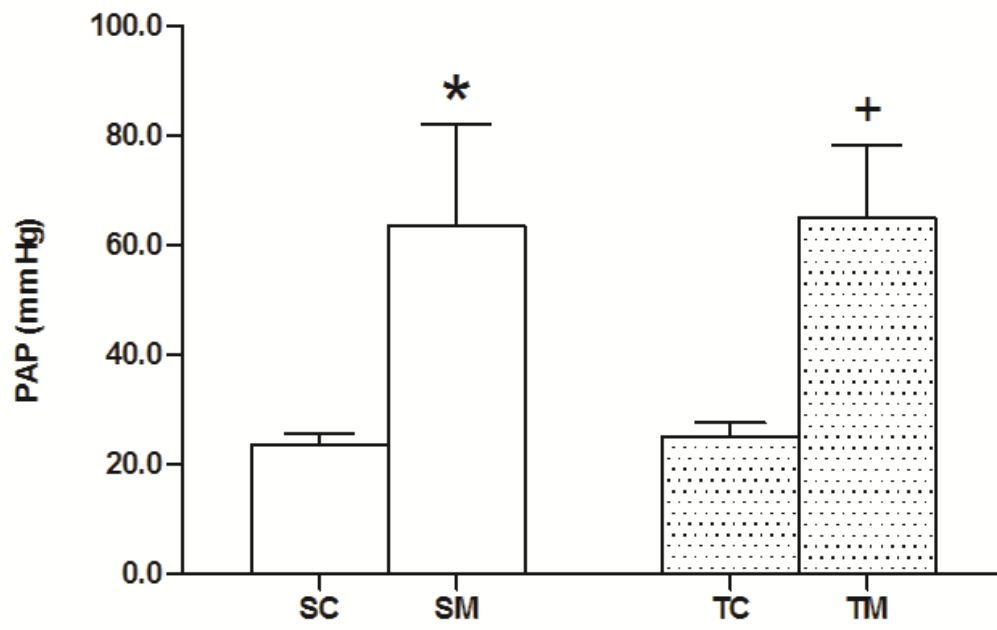


Figure 3

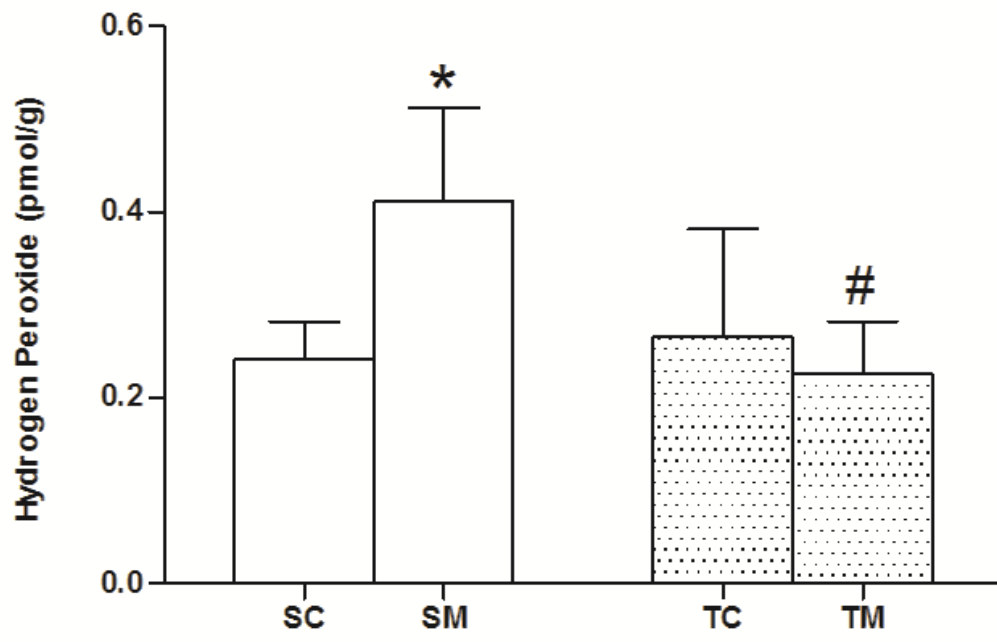


Figure 4

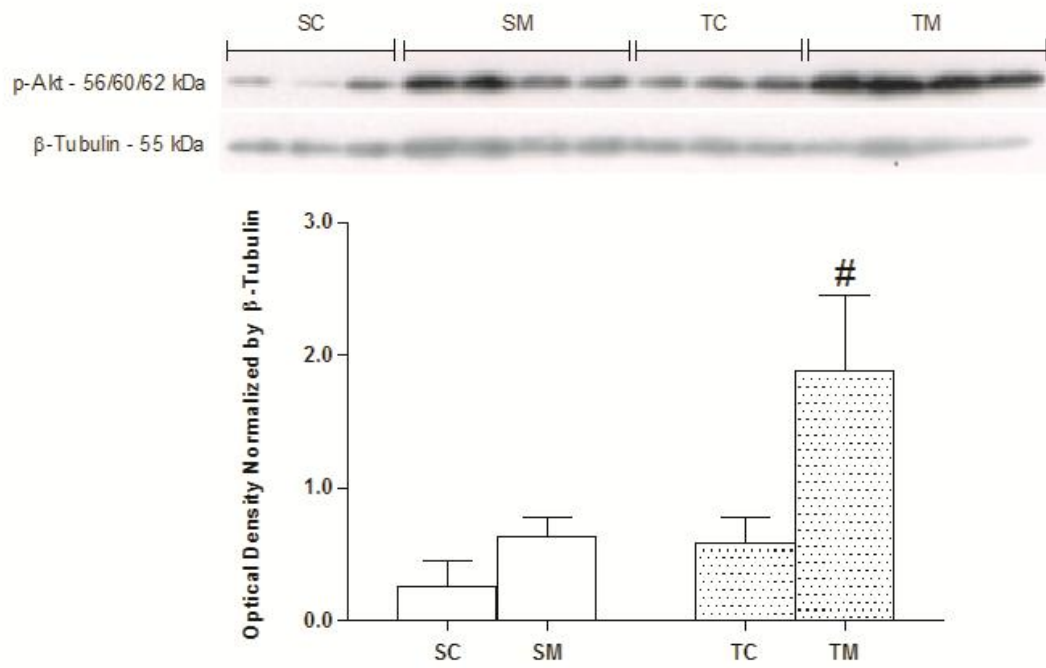


Figure 5

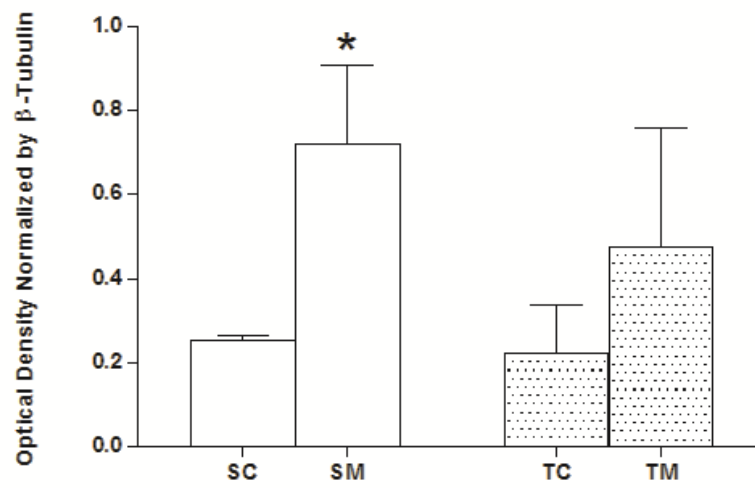
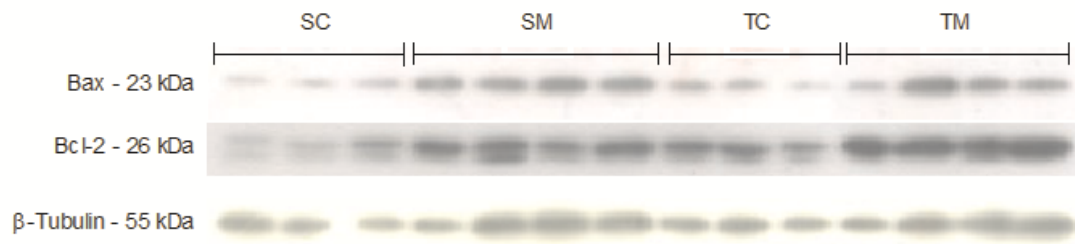


Figure 6

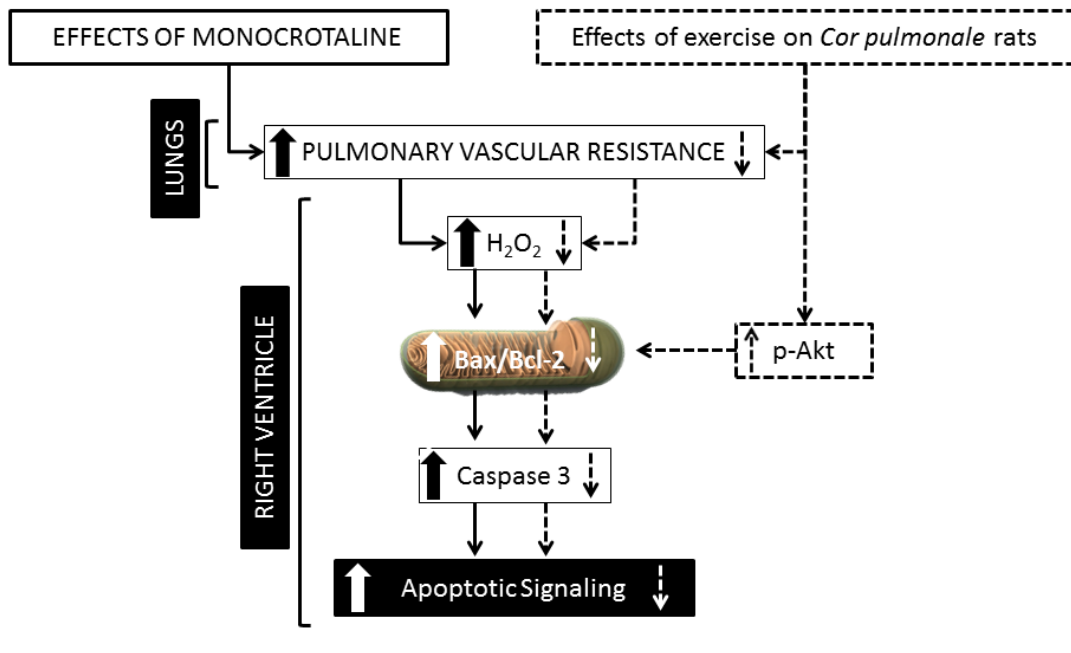


Figure Captions

Figure 1. Acceleration time/Ejection time (AT/ET ratio). Values are expressed as mean \pm SD (n=4–5). SC = sedentary control; SM = sedentary monocrotaline; TC = trained control; TM = trained monocrotaline. (A) AT/ET ratio; (B) representative image of pulmonary artery outflow by pulsed-wave doppler. *P < 0.05 compared to SC.

Figure 2. Pulmonary artery pressure (PAP) in mmHg. Values are expressed as mean \pm SD (n=6). SC = sedentary control; SM = sedentary monocrotaline; TC = trained control; TM = trained monocrotaline. *P < 0.05 compared to SC; #P < 0.05 compared to TC.

Figure 3. Right ventricle hydrogen peroxide levels. Values are expressed as mean \pm SD (n=6–8). SC = sedentary control; SM = sedentary monocrotaline; TC = trained control; TM = trained monocrotaline. *P < 0.05 compared to SC; #P < 0.05 compared to SM.

Figure 4. p-Akt immunocontent. Values are expressed as mean \pm SD (n=3–4) animals. SC = sedentary control; SM = sedentary monocrotaline; TC = trained control; TM = trained monocrotaline. A representative gel from western blot experiments showing three and four bands for each experimental group. #P < 0.05 compared to SM.

Figure 5. Bax/Bcl-2 immunocontent. Values are expressed as mean \pm SD (n=3–4). SC = sedentary control; SM = sedentary monocrotaline; TC = trained control; TM = trained monocrotaline. A representative gel from western blot experiments showing three and four bands for each experimental group. #P < 0.05 compared to SM.

Figure 6. Signalling proteins involved in the influence of exercise on *Cor pulmonale* resulting from pulmonary hypertension induced by monocrotaline.

Table 1. Morphometric parameters of the different experimental groups measured at the end of the experimental protocol.

Morphometric Parameters	SC	SM	TC	TM
RV/body mass (mg/g)	0.54 ± 0.04	0.98 ± 0.18*	0.65 ± 0.22	0.92 ± 0.14
RV/tibia length (mg/mm)	4.42 ± 0.54	7.23 ± 1.44*	5.06 ± 1.55	6.57 ± 0.99
RV/LV (mg/mg)	0.28 ± 0.03	0.48 ± 0.10*	0.32 ± 0.10	0.47 ± 0.07

Values are expressed as mean ± SD (n=7-9) in each group. SC = sedentary control; SM = sedentary monocrotaline; TC = trained control; TM = trained monocrotaline. *P < 0.05 compared to SC.

Table 2. Proteins involved in exercise-induced hypertrophy and apoptotic signalling.

Evaluated proteins (optical density normalized by β -tubulin)	SC	SM	TC	TM
PI3K	0.53 ± 0.42	0.10 ± 0.06	0.19 ± 0.09	0.31 ± 0.12
Akt	2.37 ± 1.13	1.11 ± 0.59	1.72 ± 0.09	2.34 ± 1.19
Caspase 3	0.95 ± 0.25	3.79 ± 0.72*	2.18 ± 0.49	1.98 ± 0.58 [#]

Values are expressed as mean ± SD (n=3-4) in each group. SC = sedentary control; SM = sedentary monocrotaline; TC = trained control; TM = trained monocrotaline. A representative gel from western blot experiments showing three and four bands for each experimental group. P < 0.05 between SM and SC; [#]P < 0.05 between TM and SM.

REFERENCE LIST

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121–6, jan. 1984.
- AOYAGI, T.; MATSUI, T. Phosphoinositide-3 kinase signaling in cardiac hypertrophy and heart failure. **Current pharmaceutical design**, v. 17, n. 18, p. 1818–24, jan. 2011.
- ARAUJO, A. S. R. et al. Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 249, n. 1-2, p. 133–9, 25 abr. 2006.
- ARENA, R. et al. The Effect of Exercise Training on the Pulmonary Arterial System in Patients With Pulmonary Hypertension. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 57, n. 5, p. 480–488, 2014.
- BENZA, R. L. et al. Predicting survival in pulmonary arterial hypertension: insights from the Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management (REVEAL). **Circulation**, v. 122, n. 2, p. 164–72, 13 jul. 2010.
- BERNARDO, B. C. et al. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacology & therapeutics**, v. 128, n. 1, p. 191–227, out. 2010.
- BOGAARD, H. J. et al. The right ventricle under pressure. **Chest**, v. 135, n. 3, p. 794–804, 2009.
- BURGOYNE, J. R. et al. Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling by Protein Kinases in the Cardiovascular System. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 9, p. 120917065115006, 2012.
- BUYS, R.; AVILA, A.; CORNELISSEN, V. A. Exercise training improves physical fitness in patients with pulmonary arterial hypertension: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 15, n. 1, 2015.
- CAMPOS, J. C.; GOMES, K. M. S.; FERREIRA, J. C. B. Impact of exercise training on redox signaling in cardiovascular diseases. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 62, n. 2, p. 107–19, 2013.
- CHEN, L. et al. Both hydrogen peroxide and transforming growth factor beta 1 contribute to endothelial Nox4 mediated angiogenesis in endothelial. **BBA - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 12, p. 2489–2499, 2014.
- CHEN, Y. L. et al. Urotensin II prevents cardiomyocyte apoptosis induced by doxorubicin via Akt and ERK. **European Journal of Pharmacology**, v. 680, n. 1-3, p. 88–94, 2012.
- CLAESSON-WELSH, L.; WELSH, M. VEGFA and tumour angiogenesis. **Journal of Internal Medicine**, v. 273, n. 2, p. 114–127, 2013.
- COCHAIN, C.; CHANNON, K. M.; SILVESTRE, J.-S. Angiogenesis in the Infarcted Myocardium. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 9, p. 120925062555007, 2012.
- COLOMBO, R. et al. Effects of exercise on monocrotaline-induced changes in right heart function and pulmonary artery remodeling in rats. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 91, n. 1, p. 38–44, jan. 2013.

DALY, C. et al. Angiopoietin-2 functions as an autocrine protective factor in stressed endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 42, p. 15491–6, 17 out. 2006.

DEISSEROTH, A.; DOUNCE, A. L. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. **Physiological reviews**, v. 50, n. 3, p. 319–75, jul. 1970.

DORN, G. W. Mechanisms of non-apoptotic programmed cell death in diabetes and heart failure. **Cell Cycle**, v. 9, n. 17, p. 3442–3448, 2010.

DORN, G. W. Molecular Mechanisms That Differentiate Apoptosis from Programmed Necrosis. **Toxicologic Pathology**, v. 41, n. 2, p. 227–234, 2012.

DUMITRASCU, R. et al. Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury. **BMC pulmonary medicine**, v. 8, p. 25, 2008.

FAGIANI, E.; CHRISTOFORI, G. Angiopoietins in angiogenesis. **Cancer Letters**, v. 328, n. 1, p. 18–26, 2013.

FARAHMAND, F.; HILL, M. F.; SINGAL, P. K. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 260, n. 1-2, p. 21–9, maio 2004.

FILIPPA, N. et al. Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 7, p. 4989–5000, jul. 1999.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 114–21, jan. 1984.

FLUSBERG, D. A.; SORGER, P. K. Surviving apoptosis: life–death signaling in single cells. **Trends in Cell Biology**, p. 1–13, 2015.

FORMAN, H. J.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Signaling functions of reactive oxygen species. **Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 835–842, 2010.

FRASIER, C. R.; MOORE, R. L.; BROWN, D. A. Exercise-induced cardiac preconditioning: how exercise protects your achy-breaky heart. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 111, n. 3, p. 905–15, set. 2011.

GOMEZ-ARROYO, J. G. et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. **AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 302, n. 4, p. L363–L369, 2012.

GOUNDER, S. S. et al. Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e45697, jan. 2012.

GURTU, V.; MICHELAKIS, E. D. Emerging Therapies and Future Directions in Pulmonary Arterial Hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 31, n. 4, p. 489–501, 2015.

HANDOKO, M. L. et al. Opposite effects of training in rats with stable and progressive pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 120, n. 1, p. 42–49, 2009.

HOEPER, M. M. et al. Outcome after cardiopulmonary resuscitation in patients with pulmonary arterial hypertension. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 165, n. 3, p. 341–4, 1 fev. 2002.

HU, L.; SUN, Y.; HU, J. Catalpol inhibits apoptosis in hydrogen peroxide-induced endothelium by activating the PI3K/Akt signaling pathway and modulating expression of Bcl-2 and Bax. **European Journal of Pharmacology**, v. 628, n. 1-3, p. 155–163, 2010.

IMHOF, B. A; AURRAND-LIONS, M. Angiogenesis and inflammation face off. **Nature medicine**, v. 12, n. 2, p. 171–172, 2006.

JONES, J. E. et al. Serial noninvasive assessment of progressive pulmonary hypertension in a rat model. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 283, n. 1, p. H364–71, jul. 2002.

KAVAZIS, A. N. Exercise preconditioning of the myocardium. **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 39, n. 11, p. 923–35, jan. 2009.

KAWANISHI, N. et al. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. **Exercise immunology review**, v. 16, p. 105–18, jan. 2010.

KIM, Y. M. et al. Hydrogen peroxide produced by angiotensin-1 mediates angiogenesis. **Cancer research**, v. 66, n. 12, p. 6167–74, 15 jun. 2006.

KIM, Y.-W.; BYZOVA, T. V. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. **Blood**, v. 123, n. 5, p. 625–31, 2014.

KOSKENVUO, J. W. et al. A comparison of echocardiography to invasive measurement in the evaluation of pulmonary arterial hypertension in a rat model. **The international journal of cardiovascular imaging**, v. 26, n. 5, p. 509–18, jun. 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.

LEOSCO, D. et al. Exercise promotes angiogenesis and improves β -adrenergic receptor signalling in the post-ischaemic failing rat heart. **Cardiovascular Research**, v. 78, n. 2, p. 385–394, 2008.

LI, D.-Q. et al. Catalpol modulates the expressions of Bcl-2 and Bax and attenuates apoptosis in gerbils after ischemic injury. **Brain research**, v. 1115, n. 1, p. 179–85, 18 out. 2006.

LIAO, J. K. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 2, p. 540–1, fev. 2013.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.

MAILLET, M.; VAN BERLO, J. H.; MOKKENTIN, J. D. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 14, n. 1, p. 38–48, jan. 2013.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 47, n. 3, p. 469–74, 16 set. 1974.

MCMULLEN, J. R.; JENNINGS, G. L. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 34, n. 4, p. 255–62, abr. 2007.

- MILLER, T. W.; ISENBERG, J. S.; ROBERTS, D. D. Molecular regulation of tumor angiogenesis and perfusion via redox signaling. **Chemical reviews**, v. 109, n. 7, p. 3099–124, jul. 2009.
- MONAGHAN-BENSON, E.; BURRIDGE, K. The regulation of vascular endothelial growth factor-induced microvascular permeability requires Rac and reactive oxygen species. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 38, p. 25602–11, 18 set. 2009.
- MONTANI, D. et al. Pulmonary arterial hypertension. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 8, n. 1, p. 97, 2013.
- NEWBY, A. C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. **Cardiovascular research**, v. 69, n. 3, p. 614–24, 15 fev. 2006.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, jun. 1979.
- PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of immunological methods**, v. 38, n. 1-2, p. 161–70, jan. 1980.
- RAMOS, M. et al. Monocrotaline pyrrole induces Smad nuclear accumulation and altered signaling expression in human pulmonary arterial endothelial cells. **Vascular pharmacology**, v. 46, n. 6, p. 439–48, jun. 2007.
- REID, M. J. et al. Monocrotaline metabolism and distribution in Fisher 344 and Sprague-Dawley rats. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 117, n. 1, p. 115–123, 1997.
- RHEE, S. G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. **Experimental & molecular medicine**, v. 31, n. 2, p. 53–9, 30 jun. 1999.
- RODRIGUES, B. et al. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. **Cardiovascular diabetology**, v. 6, p. 38, jan. 2007.
- RUDSKI, L. G. et al. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and t. **Journal of the American Society of Echocardiography: official publication of the American Society of Echocardiography**, v. 23, n. 7, p. 685–713; quiz 786–8, jul. 2010.
- RUNO, J. R.; LOYD, J. E. Primary pulmonary hypertension. **Lancet**, v. 361, n. 9368, p. 1533–44, 3 maio 2003.
- SAMJOO, I. A et al. The effect of endurance exercise on both skeletal muscle and systemic oxidative stress in previously sedentary obese men. **Nutrition & diabetes**, v. 3, n. 9, p. e88, 2013.
- SATOH, K. et al. Basigin mediates pulmonary hypertension by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation. **Circulation research**, v. 115, n. 8, p. 738–50, 26 set. 2014.
- SAVAI, R. et al. Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 186, n. 9, p. 897–908, 1 nov. 2012.

- SEHGAL, P. B.; MUKHOPADHYAY, S. Dysfunctional intracellular trafficking in the pathobiology of pulmonary arterial hypertension. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 37, n. 1, p. 31–7, jul. 2007.
- SHAO, D. et al. Redox modification of cell signaling in the cardiovascular system. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, n. 3, p. 550–558, 2012.
- SIMONNEAU, G. et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 25 SUPPL., 2013.
- SINHA, K. et al. Oxidative stress: The mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 7, p. 1157–1180, 2013.
- SONG, G.; OUYANG, G.; BAO, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 9, n. 1, p. 59–71, jan. .
- SOUZA-RABBO, M. P. et al. Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 35, n. 8, p. 944–948, 2008a.
- SOUZA-RABBO, M. P. et al. EFFECTS OF A CHRONIC EXERCISE TRAINING PROTOCOL ON OXIDATIVE STRESS AND RIGHT VENTRICULAR HYPERTROPHY IN MONOCROTALINE-TREATED RATS. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, n. 8, p. 944–948, ago. 2008b.
- STARINES, J. W.; BARNES, B. D.; OLSEN, M. E. Exercise training decreases rat heart mitochondria free radical generation but does not prevent Ca²⁺-induced dysfunction. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 102, n. 5, p. 1793–8, maio 2007.
- STOCKER, R.; KEANEY, J. F. New insights on oxidative stress in the artery wall. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 3, n. 8, p. 1825–34, ago. 2005.
- TAKANO, H. et al. Oxidative stress-induced signal transduction pathways in cardiac myocytes: involvement of ROS in heart diseases. **Antioxidants & redox signaling**, v. 5, n. 6, p. 789–794, 2003.
- TEICHERT-KULISZEWSKA, K. et al. Biological action of angiotensin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. **Cardiovascular research**, v. 49, n. 3, p. 659–70, 16 fev. 2001.
- THURSTON, G. et al. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiotensin-1. **Science (New York, N.Y.)**, v. 286, n. 5449, p. 2511–4, 24 dez. 1999.
- URBONIENE, D. et al. Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 299, n. 3, p. L401–L412, 2010.
- VAILLANCOURT, M. et al. Adaptation and Remodelling of the Pulmonary Circulation in Pulmonary Hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 31, p. 407–415, 2014.
- VAN CRAENENBROECK, E. M. et al. Exercise acutely reverses dysfunction of circulating angiogenic cells in chronic heart failure. **European Heart Journal**, v. 31, n. 15, p. 1924–1934, 2010.

VONK-NOORDEGRAAF, A. et al. Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: Physiology and pathobiology. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 25 SUPPL., p. 22–33, 2013.

WAXMAN, A. B. Exercise physiology and pulmonary arterial hypertension. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 55, n. 2, p. 172–9, jan. .

WHELAN, R. S.; KAPLINSKIY, V.; KITSIS, R. N. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. **Annual review of physiology**, v. 72, p. 19–44, jan. 2010.

YANG, J. et al. Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. **Molecular cell**, v. 9, n. 6, p. 1227–40, jun. 2002.

YASUDA, M. et al. Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells. **Life sciences**, v. 64, n. 4, p. 249–58, jan. 1999.

YU, J. C. et al. Temporal changes of angiopoietins and Tie2 expression in rat lungs after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Comparative Medicine**, v. 59, n. 4, p. 350–356, 2009.

YUN, J. et al. Redox-dependent mechanisms in coronary collateral growth: the “redox window” hypothesis. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 8, p. 1961–74, ago. 2009.

ZHAO, K. et al. Wogonin inhibits LPS-induced tumor angiogenesis via suppressing PI3K/Akt/NF- κ B signaling. **European Journal of Pharmacology**, v. 737, p. 57–69, 2014.

ZHOU, Y. et al. Reactive Oxygen Species in Vascular Formation and Development. v. 2013, 2013.

6. DISCUSSÃO CONCLUSIVA

Os principais achados desse estudo nos indicam que o exercício aeróbio promove alterações benéficas em ratos com *Cor pulmonale*. Essa resposta passa por um estímulo para a angiogênese pulmonar dependente do sinal H_2O_2 /VEGF/Akt e uma diminuição do sinal apoptótico no VD dependente do sinal Bax/Caspase 3. Essa alteração molecular provocada pelo exercício está relacionada a uma melhora na função cardíaca avaliada pelo cateterismo da jugular direita e pela ecocardiografia transtorácica.

A discussão conclusiva será apresentada na sequência dos eventos fisiológicos envolvidos com a HAP e progressão para a insuficiência cardíaca direita. Apresentaremos a discussão do envolvimento da sinalização para a angiogênese pulmonar dependente de H_2O_2 /VEGF/Akt e sua repercussão sobre a sobrecarga imposta ao VD, e após essa exposição, discutiremos o impacto dessas modificações sobre a diminuição da sinalização para a apoptose mediada pela peróxido de hidrogênio no VD.

6.1 O exercício aeróbio estimula o sinal angiogênico dependente do H_2O_2 /VEGF

É importante salientar que um dos objetivos deste trabalho foi avaliar o estresse oxidativo e as concentrações de H_2O_2 no parênquima pulmonar, e a sua importância na sinalização para a angiogênese no modelo de *Cor pulmonale* induzido pela monocrotalina. As ERO são moléculas sinalizadoras que influenciam muitas funções celulares, tais como, proliferação, diferenciação e apoptose. É sempre interessante lembrar que as ações exercidas pelas ERO são dependentes da sua concentração intracelular (STOCKER; KEANEY,

2005). Em baixas concentrações (0,001 a 0,1 mM), o H₂O₂ estimula a proliferação, a sobrevivência celular e a angiogênese fisiológica. A sua ação se relaciona ao evento apoptótico e com a angiogênese patológica quando a sua concentração ultrapassa a concentração de 0.7 mM (MILLER; ISENBERG; ROBERTS, 2009).

As concentrações intracelulares de H₂O₂ variam constantemente durante o decurso temporal da vida, dependendo da atividade das enzimas envolvidas com a sua redução. A catalase (CAT) é a enzima que reage diretamente com o peróxido de hidrogênio, quando em altas concentrações, com uma constante de velocidade da reação de 10⁻⁷M⁻¹s⁻¹, na tentativa de manter suas concentrações dentro de uma faixa de normalidade (DEISSEROTH; DOUNCE, 1970). Ademais, o H₂O₂ intracelular pode reagir com grupos tióis de resíduos de cisteína e metionina através do sistema das glutatonas. A glutatona peroxidase (GPx) é uma selenocisteína que reduz o H₂O₂ à água (H₂O), enquanto a peroxirredoxina (Prx), através da sua oxidação, catalisa a mesma reação com uma menor constante de *Michaelis-Menten* (k_M) (MILLER; ISENBERG; ROBERTS, 2009).

Claramente, a angiogênese fisiológica é caracterizada por períodos de alta produção de ERO, mas regulados por um sistema de defesa antioxidante enzimático eficiente. A angiogênese patológica ocorre através de um processo de formação de ERO descontrolado, causando a atração de macrófagos, o que ultimamente acaba por otimizar o efeito do estresse oxidativo sobre o processo de brotamento de novos vasos (KIM; BYZOVA, 2014).

É sabido que para a angiogênese fisiológica, a produção de ERO deve ser transitória (KIM; BYZOVA, 2014). Notavelmente, as enzimas antioxidantes

diminuem as concentrações das ERO, mantendo o estado redox intracelular e influenciando de forma benéfica a sinalização intracelular dependente das ERO. A atividade da enzima GPx nos animais treinados (TC e TM) estava aumentada quando comparada com os animais sedentários (SC e SM). Mesmo sem mostrar um aumento na atividade dessa enzima no grupo TM em relação ao grupo SM, podemos sugerir que o exercício aeróbio possa ter influenciado positivamente a atividade da GPx. Assim, sugere-se que o aumento das concentrações de peróxido de hidrogênio no parênquima pulmonar dos animais TM, possa ser minimizado pela resposta biológica benéfica observada em relação a atividade da GPx, e assim, auxiliar na promoção da angiogênese fisiológica (Figura 2E – Artigo I). A enzima catalase (CAT) demonstrou uma atividade reduzida nos animais SM, em comparação aos animais SC. Nos animais TM, a atividade da CAT não foi diferente da atividade dos grupos controle (SC e TC) (Figura 2C – Artigo I).

Como citado anteriormente, devido a sua maior estabilidade celular, o peróxido de hidrogênio pode atuar como um segundo mensageiro intracelular. Em estudo publicado por Lili Chen *et al.*, evidências sugerem que a produção aumentada de H_2O_2 pelo aumento na atividade da enzima NADPH oxidase 4 (Nox4) nas células endoteliais (CEs), promove a formação de novos vasos através de sinais intracelulares que são mediados pelo aumento da expressão do receptor 2 para o VEGF (VEGFR2), da quinase dependente do AMPc (PKA), e da eNOS (CHEN *et al.*, 2014). Outro estudo mostra que as CEs quiescentes produzem grandes quantidades de H_2O_2 , e assim, otimizam a sinalização intracelular para a angiogênese (ZHOU *et al.*, 2013). A sinalização dependente do H_2O_2 pode influenciar a atividade e o metabolismo das CEs. Em

baixas concentrações, o H₂O₂ pode induzir a expressão do VEGF, o que acaba por aumentar a atividade da PI3K e da Akt, regulando o crescimento e a sobrevivência das CEs. A ativação da PI3K promove a formação de fosfatidilinositol-3,4,5 trisfosfato (PIP3) a partir de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2), o que leva a ativação da proteína *downstream* Akt (ZHAO et al., 2014). A Akt, quando fosforilada, promove a sobrevivência das CEs e um aumento na produção de NO (FAGIANI; CHRISTOFORI, 2013).

No nosso estudo, foi observado um aumento na concentração de H₂O₂ no parênquima pulmonar nos animais com *Cor pulmonale* e que participaram do programa de exercício físico aeróbio (TM) (Figura 1A – Artigo I). Como mencionado anteriormente, o H₂O₂ está intimamente associado com a sinalização dependente do VEGF, resultado que também foi observado no nosso estudo. Os animais do grupo TM demonstraram um aumento no imunoconteúdo do VEGF (Figura 3A – Artigo I), evento que foi confirmado pela análise dessa mesma proteína através da técnica de imunohistoquímica (Figura 3B – Artigo I). A correlação entre esses dois eventos foi realizada através da correlação de *Pearson*, mostrando que as concentrações de peróxido e o imunoconteúdo do VEGF no parênquima pulmonar se correlacionaram positivamente ($r = 0,77$, $P < 0,05$) (Figura 5A – Artigo I).

Quando analisamos a fosforilação da Akt nos animais TM, foi notado um aumento significativo no seu imunoconteúdo quando comparado ao grupo SM (Figura 3H – Artigo I). Claramente, nota-se que o exercício foi capaz de aumentar a fosforilação desta importante proteína envolvida com a sobrevivência celular nos animais com *Cor pulmonale*. Entretanto, no nosso estudo, a fosforilação da Akt parece não ter sido mediada pela via clássica da

PI3K/PIP3. Foi visualizada uma redução no imunoconteúdo da PI3K nos animais com *Cor pulmonale*, fortalecendo a hipótese de que a fosforilação da Akt não foi mediada pela PI3K (Figura 3E – Artigo I). No grupo TM, foi visualizado um aumento no imunoconteúdo da fosfatase homóloga à tensina (PTEN), uma proteína envolvida na desfosforilação da PIP3, formando novamente PIP2, e assim inibindo a via de sinalização da PI3K/Akt (Figura 3F – Artigo I). No entanto, mesmo com um aumento no imunoconteúdo da PTEN, e sem perceber alterações quanto à PI3K, é possível sugerir que o sinal para a angiogênese fisiológica tenha sido fortalecido nos animais com *Cor pulmonale* e que realizaram o exercício aeróbio crônico. De maneira importante, após o seu transporte para a membrana plasmática, a Akt pode ser fosforilada pela proteína quinase-1 dependente do fosfoinosítideo (PDK1) e pela proteína alvo da rapamicina em mamíferos 2 (mTORC2). A atividade dessas duas enzimas ativa completamente a Akt e, assim, ela acaba por exercer seu papel sobre a angiogênese fisiológica. Ambas as proteínas não foram avaliadas no nosso trabalho, nos impossibilitando de inferir qualquer conclusão acerca do envolvimento de proteínas *upstream* à Akt no processo de sinalização para a angiogênese.

Outro sinal importante para a sobrevivência das CEs pode ser gerado pela ligação da Ang-1 ao seu receptor tirosina quinase (Tie-2). Este sinal intracelular atua na manutenção da homeostasia e na maturação fisiológica dos novos vasos, agindo sobre o controle normal da angiogênese e estimulando a adesão da matriz extracelular. A maturação vascular é desencadeada pela deposição extracelular de colágeno tipo IV, o principal componente da matriz extracelular vascular. A deposição de colágeno é um importante fator envolvido

na estabilização do novo vaso (FAGIANI; CHRISTOFORI, 2013). Assim, fica claro que o sinal desencadeado pela ligação Ang-1/Tie-2, é um importante mediador para a angiogênese fisiológica. Os mecanismos moleculares envolvidos com as respostas benéficas mencionadas acima parecem estar relacionados com a ativação da via de sinalização da Akt, da mesma forma como o faz a proteína VEGF. A ligação da Ang-1 ao seu receptor (Tie-2), em última análise, acaba por fosforilar a proteína Akt, que através da inibição da quinase da glicogênio sintase 3 β (GSK3 β), estimula a estabilização vascular. É importante mencionar que, numa situação de estresse crônico vascular, seja ela desencadeada por hipóxia crônica ou inflamação, é comum observar um aumento da produção de Ang-2, proteína que atua antagonizando os efeitos benéficos gerados pela Ang-1. Em situações inflamatórias, os macrófagos e as CEs aumentam a expressão da Ang-2, podendo dessa forma, desestabilizar o endotélio vascular, causar um crescimento descontrolado do vaso, e estimular a perda da sua função (DALY et al., 2006; FAGIANI; CHRISTOFORI, 2013; TEICHERT-KULISZEWSKA et al., 2001).

Verificou-se por meio da análise imunohistoquímica uma coloração positiva para a Ang-1 nos animais SM e TM (Figura 3C – Artigo I) Ang-1. No entanto, não foram observadas alterações quanto à presença do receptor Tie-2 entre os diferentes grupos experimentais (Figura 3D – Artigo I). Levando em consideração a análise histológica, não notamos nenhuma alteração na quantidade de macrófagos (Figura 4A – Artigo I) e no infiltrado inflamatório (Figura 4B – Artigo I) no parênquima pulmonar dos diferentes grupos experimentais. A partir da análise desses dados, pode-se sugerir que o exercício aeróbio em ratos com *Cor pulmonale* pode ter exercido um papel

benéfico sobre a sinalização para a angiogênese. Ainda, sugere-se que esta vantagem esteja relacionada com a sinalização inicial desencadeada pelo H_2O_2 / VEGF/p-Akt. Além disso, a sinalização dependente da Ang-1/Tie-2 e a ausência de uma diferença em relação ao processo inflamatório entre os diferentes grupos e o grupo TM, reforça a ideia de que estes animais são influenciados pelo sinal para a angiogênese fisiológica. Ainda, sugere-se que todas essas respostas bioquímicas e moleculares possam estar envolvidas no desenvolvimento de rotas colaterais para o fluxo sanguíneo pulmonar.

6.2 O exercício aeróbio melhora a função ventricular direita

Após a análise da sinalização para a angiogênese e a sua possível influência sobre a função e estrutura do ventrículo direito em ratos com HAP, tivemos como principal objetivo para o prosseguimento deste estudo, analisar o papel do exercício aeróbio sobre proteínas envolvidas com a sobrevivência e apoptose celular no ventrículo direito.

Sabe-se que a inflamação vascular, a vasoconstrição, o aumento da espessura da túnica média das arteríolas pulmonares e a diminuição da quantidade de vasos, em resposta a injeção de MCT, provoca um aumento da pós-carga imposto ao VD neste modelo experimental de *Cor pulmonale*. Dessa forma, como um mecanismo compensatório, na tentativa de manter um débito cardíaco adequado, percebe-se um aumento do estresse de parede, hipertrofia do VD e insuficiência cardíaca direita (BOGAARD et al., 2009; GOMEZ-ARROYO et al., 2012). Em estudos anteriores do nosso grupo, foi demonstrado que a monocrotalina aumenta a massa do VD, estimulando a hipertrofia ventricular direita. O exercício aeróbio não foi capaz de mitigar esse desfecho

21 dias após a injeção de monocrotalina (COLOMBO et al., 2013). No entanto, o exercício aeróbio promoveu uma redução do volume da matriz extracelular no VD, estimulou um aumento no volume de vasos intramiocárdicos, e reduziu a pressão diastólica final no VD (COLOMBO et al., 2013; SOUZA-RABBO et al., 2008).

No nosso estudo, ficou claro que o exercício aeróbio promoveu uma melhora funcional no RV após a avaliação ecocardiográfica final. Mesmo sem apresentar alterações nos índices que identificam a hipertrofia do VD nos animais monocrotalina (Tabela 1 – Artigo I), a função cardíaca parece estar preservada nos animais TM. Após 21 dias da injeção de monocrotalina (60 mg/kg), em comparação com os grupos controle (SC e TC), os animais TM mantiveram o débito cardíaco (CO), o volume sistólico (SV) e o TAPSE (Tabela 1 – Artigo I). Além disso, o grupo TM mostrou um aumento na mudança de área fracional (FAC) (Figura 6B – Artigo I) e um aumento da fração de encurtamento (FS) (Figura 6C – Artigo I), quando comparado com os animais SM. Sugere-se que esta melhora tenha sido influenciada pelos efeitos diretos do exercício aeróbio sobre a função cardíaca (alguns destes efeitos são mencionados nos parágrafos anteriores). Além disso, no presente estudo, a melhora da função cardíaca mostrou estar associada com o aumento no sinal para a angiogênese dependente do sinal H_2O_2 /VEGF/Akt.

Analisando as modificações pulmonares provocadas pelo exercício aeróbio em ratos com *Cor pulmonale*, notamos um aumento no imunoconteúdo de proteínas envolvidas com a sinalização para a angiogênese. Podemos sugerir que a melhora funcional observada através da avaliação ecocardiográfica pode ter sido um reflexo de uma menor pós-carga imposta ao

VD. Ademais, a menor pós-carga pode ter sido mediada pelo aumento de rotas alternativas para o fluxo sanguíneo pulmonar. Para testar essa hipótese, analisou-se o papel modulador do exercício aeróbio sobre a resistência vascular pulmonar, avaliada através da relação AT/ET na artéria pulmonar. Os nossos resultados mostraram que a diminuição da razão AT/ET sugere um aumento da resistência vascular pulmonar nos animais SM quando comparados aos animais SC (Figura 1 – Artigo II). No entanto, nos animais que receberam a monocrotalina e que foram submetidos ao exercício físico (TM), a resistência vascular pulmonar não apresentou diferenças em relação aos grupos controle. Esse achado pode estar relacionado com a melhora funcional apresentada anteriormente e com o remodelamento adaptativo do VD.

6.3 Efeitos do exercício aeróbio sobre o remodelamento do ventrículo direito

Em um estudo anterior do nosso grupo, foi observado que o exercício aeróbico não foi capaz de minimizar a hipertrofia cardíaca induzida pela monocrotalina. No entanto, como citado anteriormente, nesse estudo foi visualizada uma redução na matriz extracelular e um aumento no volume de vasos intramiocárdicos (COLOMBO et al., 2013). Handoko *et al.*, demonstraram que o exercício foi capaz de aumentar em 25% a capilarização no tecido cardíaco, fato que pode estar associado a uma melhor perfusão tecidual e restauração da função cardíaca após uma sobrecarga de pressão (pós-carga) (HANDOKO et al., 2009). No presente estudo, a hipertrofia mal-adaptativa observada nos ratos SM foi gerada devido ao aumento da pós-carga imposta pela elevação da pressão média na artéria pulmonar, um desfecho

comum no *Cor pulmonale* (Tabela 1 – Artigo II). A mudança percentual na hipertrofia no VD nos animais de TM, em comparação com o grupo TC foi de 29%, valor sem diferença estatística, entretanto, uma variação percentual menor que a apresentada pelo grupo SM quando comparado ao grupo SC (63%). A razão AT/ET, como mostrado anteriormente, demonstrou o mesmo padrão de resposta. Assim, pode-se sugerir que o exercício minimizou a resistência vascular pulmonar e, conseqüentemente, a hipertrofia do VD gerada pelo aumento da pós-carga imposta pela monocrotalina neste modelo HAP severa.

6.4 Imunoconteúdo de proteínas apoptóticas no ventrículo direito

É sabido que a apoptose é um evento associado à hipertrofia mal-adaptativa. A apoptose é observada após sobrecarga de pressão ou isquemia, e está ligada à progressão para o *Cor pulmonale* (WHELAN; KAPLINSKIY; KITSIS, 2010). Na hipertrofia cardíaca mal-adaptativa e na insuficiência cardíaca é comum observar um aumento na expressão da Bax, proteína da membrana mitocondrial que promove a formação de poros mitocondriais, liberando o citocromo c. A liberação de citocromo c atua na ativação da apoptose através da formação do apoptossomo e ativação das caspases, um fenômeno que está diretamente ligado a uma diminuição na contratilidade cardíaca (DORN, 2010). No nosso modelo experimental, o imunoconteúdo da Bax (Figura 5 – Artigo II) e da caspase-3 (Tabela 2 – Artigo II) aumentaram nos animais que receberam monocrotalina em comparação com os animais controle. Isto sugere que o nosso modelo de *Cor pulmonale* segue o mesmo

perfil molecular para a apoptose que outros modelos patológicos de doenças cardiovasculares (DORN, 2010; WHELAN; KAPLINSKIY; KITSIS, 2010).

Além da sinalização apoptótica dependente da Bax, outras proteínas estão envolvidas com eventos anti-apoptóticos, tal como a proteína Bcl-2, responsável pela supressão da abertura dos poros da membrana mitocondrial (SINHA et al., 2013). Esta supressão é devida à ação antagonista da Bcl-2 em relação à Bax (DORN, 2012). Neste estudo, verificou-se que os animais que receberam monocrotalina e que desenvolveram o *Cor pulmonale* mostraram um aumento na relação Bax/Bcl-2 no VD, ao final do protocolo experimental. Isto sugere que o sinal apoptótico está reforçado nesta doença.

Existem claras evidências na literatura científica de que o estado redox, principalmente o H₂O₂, está envolvido na modulação da apoptose. Sabe-se que o peróxido de hidrogênio pode estimular a liberação mitocondrial de citocromo c. Assim, sugere-se que o aumento das concentrações de H₂O₂ no VD dos animais SM (Figura 3 – Artigo II), quando comparados aos animais SC, está associado com o aumento no sinal apoptótico observado. Apesar de termos informações suficientes para fortalecer a ideia de que há uma relação entre as concentrações de peróxido de hidrogênio intracelular e o aumento do sinal para a apoptose, os mecanismos envolvidos com essa resposta ainda não estão totalmente elucidados.

6.5 Influência do exercício aeróbio sobre proteínas de sinalização no ventrículo direito

Os nossos resultados sugerem que a expressão de proteínas envolvidas com apoptose e a concentração de H₂O₂ no VD de ratos com *Cor pulmonale*

são moduladas pelo exercício aeróbio. No nosso modelo experimental, cinco semanas de exercício aeróbio em esteira foram capazes de diminuir a expressão da caspase-3 e reduzir as concentrações de H_2O_2 nos animais TM quando comparados aos animais SM. Estes dados sugerem que o exercício aeróbio exerça um papel anti-apoptótico neste modelo de HAP severa. Além disso, essa melhora parece estar relacionada à diminuição nas concentrações de H_2O_2 . Além do exercício aeróbio promover uma melhora na capacidade aeróbia, ele está diretamente envolvido com adaptações celulares metabólicas, incluindo a biogênese mitocondrial, uma melhora na eficiência da fosforilação oxidativa mitocondrial no coração, uma redução da permeabilidade dos poros de transição mitocondrial, e um aumento na atividade enzimática antioxidante (CAMPOS; GOMES; FERREIRA, 2013). Um dos possíveis mecanismos pelo qual o exercício aeróbio pode exercer um efeito cardioprotetor pode ser através do aumento da expressão de enzimas antioxidantes e proteínas anti-apoptóticas no tecido cardíaco, promovendo uma redução da apoptose em situações de isquemia/reperfusão (KAVAZIS, 2009). Uma das principais proteínas envolvidas com este remodelamento adaptativo e inibição da apoptose é a Akt. Além de estar envolvida com a sinalização para a sobrevivência celular e atuar na melhora do metabolismo cardíaco, a Akt está diretamente relacionada com a inibição da apoptose através de uma redução na atividade da via de sinalização apoptótica das caspases (CHEN et al., 2012; DORN, 2012; MCMULLEN; JENNINGS, 2007). Além disso, sugere-se que o exercício aeróbio possa promover uma redução na formação de peróxido de hidrogênio, possivelmente por atuar positivamente sobre o complexo mitocondrial I (STARNES; BARNES; OLSEN, 2007). Ainda, propõe-se que a

diminuição na produção de ERO promovida pelo exercício aeróbio possa ter influenciado a redução na expressão de caspase 3 visualizada, e assim, mediar uma diminuição na permeabilidade mitocondrial e uma redução da sinalização para a apoptose mediada pela Akt nos ratos TM.

Fica claro na literatura que a ativação da Akt na hipertrofia adaptativa induzida pelo exercício físico é dependente da via de sinalização do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1)/PI3K (MCMULLEN; JENNINGS, 2007). Esta sinalização está associada a uma série de respostas intracelulares; dentre elas, o aumento da síntese proteica, alterações na expressão de genes, uma melhora na perfusão tecidual e um efeito benéfico sobre o metabolismo energético. Seguindo esta lógica, a PI3K é ativada pela ligação do IGF-1 ao seu receptor tirosina-quinase, aumentando a formação de fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PtdIns (3,4,5) P3). A formação de PtdIns (3,4,5) P3 é o principal mecanismo envolvido com a ativação da Akt. No entanto, como comentado anteriormente, a PDK1 também pode atuar em conjunto com os PtdIns (3,4,5) P3, estimulando a sinalização dependente da Akt (MAILLET; VAN BERLO; MOLKENTIN, 2013). Além disso, é importante lembrar que a enzima PTEN age desfosforilando o PtdIns (3,4,5) P3, inibindo a ativação da Akt e a sinalização para a hipertrofia cardíaca adaptativa (AOYAGI; MATSUI, 2011; MAILLET; VAN BERLO; MOLKENTIN, 2013). Embora não tenha sido observada nenhuma mudança estatisticamente significativa no imunocontéudo da PI3K (Tabela 2 – Artigo II), nós não exploramos todos os fatores envolvidos com a ativação da Akt. Assim, não podemos descartar a ideia de que esta via clássica para a hipertrofia adaptativa e inibição da apoptose possa

estar envolvida com a resposta benéfica observada nos animais com *Cor pulmonale* e que participaram do programa de exercício físico aeróbio.

Levando em consideração todos os resultados apresentados anteriormente, podemos concluir que o exercício aeróbio estimulou a via de sinalização dependente do H₂O₂/VEGF/Akt no pulmão de animais com *Cor pulmonale*. Esse sinal para a angiogênese pode estar envolvido com uma menor sobrecarga de pressão imposta ao VD e com uma atenuação da sinalização para a apoptose dependente da Bax e da Caspase 3. Ademais, a alteração molecular provocada pelo exercício aeróbio atenuou a disfunção cardíaca avaliada através do cateterismo do VD e da ecocardiografia.

7. LISTA DE REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121–6, jan. 1984.

AOYAGI, T.; MATSUI, T. Phosphoinositide-3 kinase signaling in cardiac hypertrophy and heart failure. **Current pharmaceutical design**, v. 17, n. 18, p. 1818–24, jan. 2011.

ARAUJO, A. S. R. et al. Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 249, n. 1-2, p. 133–9, 25 abr. 2006.

ARENA, R. et al. The Effect of Exercise Training on the Pulmonary Arterial System in Patients With Pulmonary Hypertension. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 57, n. 5, p. 480–488, 2014.

BENZA, R. L. et al. Predicting survival in pulmonary arterial hypertension: insights from the Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management (REVEAL). **Circulation**, v. 122, n. 2, p. 164–72, 13 jul. 2010.

BERNARDO, B. C. et al. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacology & therapeutics**, v. 128, n. 1, p. 191–227, out. 2010.

BOGAARD, H. J. et al. The right ventricle under pressure. **Chest**, v. 135, n. 3, p. 794–804, 2009.

BURGOYNE, J. R. et al. Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling by Protein Kinases in the Cardiovascular System. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 9, p. 120917065115006, 2012.

BUYS, R.; AVILA, A.; CORNELISSEN, V. A. Exercise training improves physical fitness in patients with pulmonary arterial hypertension: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 15, n. 1, 2015.

CAMPOS, J. C.; GOMES, K. M. S.; FERREIRA, J. C. B. Impact of exercise training on redox signaling in cardiovascular diseases. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 62, n. 2, p. 107–19, 2013.

CHEN, L. et al. Both hydrogen peroxide and transforming growth factor beta 1 contribute to endothelial Nox4 mediated angiogenesis in endothelial. **BBA - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 12, p. 2489–2499, 2014.

CHEN, Y. L. et al. Urotensin II prevents cardiomyocyte apoptosis induced by doxorubicin via Akt and ERK. **European Journal of Pharmacology**, v. 680, n. 1-3, p. 88–94, 2012.

CLAESSION-WELSH, L.; WELSH, M. VEGFA and tumour angiogenesis. **Journal of Internal Medicine**, v. 273, n. 2, p. 114–127, 2013.

COCHAIN, C.; CHANNON, K. M.; SILVESTRE, J.-S. Angiogenesis in the Infarcted Myocardium. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 9, p. 120925062555007, 2012.

COLOMBO, R. et al. Effects of exercise on monocrotaline-induced changes in right heart function and pulmonary artery remodeling in rats. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 91, n. 1, p. 38–44, jan. 2013.

DALY, C. et al. Angiotensin-2 functions as an autocrine protective factor in stressed endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 42, p. 15491–6, 17 out. 2006.

DEISSEROTH, A.; DOUNCE, A. L. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. **Physiological reviews**, v. 50, n. 3, p. 319–75, jul. 1970.

DORN, G. W. Mechanisms of non-apoptotic programmed cell death in diabetes and heart failure. **Cell Cycle**, v. 9, n. 17, p. 3442–3448, 2010.

DORN, G. W. Molecular Mechanisms That Differentiate Apoptosis from Programmed Necrosis. **Toxicologic Pathology**, v. 41, n. 2, p. 227–234, 2012.

DUMITRASCU, R. et al. Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury. **BMC pulmonary medicine**, v. 8, p. 25, 2008.

FAGIANI, E.; CHRISTOFORI, G. Angiotensins in angiogenesis. **Cancer Letters**, v. 328, n. 1, p. 18–26, 2013.

FARAHMAND, F.; HILL, M. F.; SINGAL, P. K. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 260, n. 1-2, p. 21–9, maio 2004.

FILIPPA, N. et al. Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 7, p. 4989–5000, jul. 1999.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 114–21, jan. 1984.

FLUSBERG, D. A.; SORGER, P. K. Surviving apoptosis: life–death signaling in single cells. **Trends in Cell Biology**, p. 1–13, 2015.

FORMAN, H. J.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Signaling functions of reactive oxygen species. **Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 835–842, 2010.

FRASIER, C. R.; MOORE, R. L.; BROWN, D. A. Exercise-induced cardiac preconditioning: how exercise protects your achy-breaky heart. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 111, n. 3, p. 905–15, set. 2011.

GOMEZ-ARROYO, J. G. et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. **AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 302, n. 4, p. L363–L369, 2012.

GOUNDER, S. S. et al. Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e45697, jan. 2012.

GURTU, V.; MICHELAKIS, E. D. Emerging Therapies and Future Directions in Pulmonary Arterial Hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 31, n. 4, p. 489–501, 2015.

HANDOKO, M. L. et al. Opposite effects of training in rats with stable and progressive pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 120, n. 1, p. 42–49, 2009.

HOEPER, M. M. et al. Outcome after cardiopulmonary resuscitation in patients with pulmonary arterial hypertension. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 165, n. 3, p. 341–4, 1 fev. 2002.

HU, L.; SUN, Y.; HU, J. Catalpol inhibits apoptosis in hydrogen peroxide-induced endothelium by activating the PI3K/Akt signaling pathway and modulating expression of Bcl-2 and Bax. **European Journal of Pharmacology**, v. 628, n. 1-3, p. 155–163, 2010.

IMHOF, B. A; AURRAND-LIONS, M. Angiogenesis and inflammation face off. **Nature medicine**, v. 12, n. 2, p. 171–172, 2006.

JONES, J. E. et al. Serial noninvasive assessment of progressive pulmonary hypertension in a rat model. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 283, n. 1, p. H364–71, jul. 2002.

KAVAZIS, A. N. Exercise preconditioning of the myocardium. **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 39, n. 11, p. 923–35, jan. 2009.

KAWANISHI, N. et al. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. **Exercise immunology review**, v. 16, p. 105–18, jan. 2010.

KIM, Y. M. et al. Hydrogen peroxide produced by angiotensin-1 mediates angiogenesis. **Cancer research**, v. 66, n. 12, p. 6167–74, 15 jun. 2006.

KIM, Y.-W.; BYZOVA, T. V. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. **Blood**, v. 123, n. 5, p. 625–31, 2014.

KOSKENVUO, J. W. et al. A comparison of echocardiography to invasive measurement in the evaluation of pulmonary arterial hypertension in a rat model. **The international journal of cardiovascular imaging**, v. 26, n. 5, p. 509–18, jun. 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.

LEOSCO, D. et al. Exercise promotes angiogenesis and improves β -adrenergic receptor signalling in the post-ischaemic failing rat heart. **Cardiovascular Research**, v. 78, n. 2, p. 385–394, 2008.

LI, D.-Q. et al. Catalpol modulates the expressions of Bcl-2 and Bax and attenuates apoptosis in gerbils after ischemic injury. **Brain research**, v. 1115, n. 1, p. 179–85, 18 out. 2006.

LIAO, J. K. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 2, p. 540–1, fev. 2013.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.

MAILLET, M.; VAN BERLO, J. H.; MOLKENTIN, J. D. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 14, n. 1, p. 38–48, jan. 2013.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 47, n. 3, p. 469–74, 16 set. 1974.

MCMULLEN, J. R.; JENNINGS, G. L. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 34, n. 4, p. 255–62, abr. 2007.

MILLER, T. W.; ISENBERG, J. S.; ROBERTS, D. D. Molecular regulation of tumor angiogenesis and perfusion via redox signaling. **Chemical reviews**, v. 109, n. 7, p. 3099–124, jul. 2009.

MONAGHAN-BENSON, E.; BURRIDGE, K. The regulation of vascular endothelial growth factor-induced microvascular permeability requires Rac and reactive oxygen species. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 38, p. 25602–11, 18 set. 2009.

MONTANI, D. et al. Pulmonary arterial hypertension. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 8, n. 1, p. 97, 2013.

NEWBY, A. C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. **Cardiovascular research**, v. 69, n. 3, p. 614–24, 15 fev. 2006.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, jun. 1979.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of immunological methods**, v. 38, n. 1-2, p. 161–70, jan. 1980.

RAMOS, M. et al. Monocrotaline pyrrole induces Smad nuclear accumulation and altered signaling expression in human pulmonary arterial endothelial cells. **Vascular pharmacology**, v. 46, n. 6, p. 439–48, jun. 2007.

REID, M. J. et al. Monocrotaline metabolism and distribution in Fisher 344 and Sprague-Dawley rats. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 117, n. 1, p. 115–123, 1997.

RHEE, S. G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. **Experimental & molecular medicine**, v. 31, n. 2, p. 53–9, 30 jun. 1999.

RODRIGUES, B. et al. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. **Cardiovascular diabetology**, v. 6, p. 38, jan. 2007.

RUDSKI, L. G. et al. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the American Society of Echocardiography: official publication of the American Society of Echocardiography, v. 23, n. 7, p. 685–713; quiz 786–8, jul. 2010.

RUNO, J. R.; LOYD, J. E. Primary pulmonary hypertension. **Lancet**, v. 361, n. 9368, p. 1533–44, 3 maio 2003.

SAMJOO, I. A et al. The effect of endurance exercise on both skeletal muscle and systemic oxidative stress in previously sedentary obese men. **Nutrition & diabetes**, v. 3, n. 9, p. e88, 2013.

SATOH, K. et al. Basigin mediates pulmonary hypertension by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation. **Circulation research**, v. 115, n. 8, p. 738–50, 26 set. 2014.

SAVAI, R. et al. Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 186, n. 9, p. 897–908, 1 nov. 2012.

SEHGAL, P. B.; MUKHOPADHYAY, S. Dysfunctional intracellular trafficking in the pathobiology of pulmonary arterial hypertension. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 37, n. 1, p. 31–7, jul. 2007.

SHAO, D. et al. Redox modification of cell signaling in the cardiovascular system. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, n. 3, p. 550–558, 2012.

SIMONNEAU, G. et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 25 SUPPL., 2013.

SINHA, K. et al. Oxidative stress: The mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 7, p. 1157–1180, 2013.

SONG, G.; OUYANG, G.; BAO, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 9, n. 1, p. 59–71, jan. .

SOUZA-RABBO, M. P. et al. Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 35, n. 8, p. 944–948, 2008a.

SOUZA-RABBO, M. P. et al. EFFECTS OF A CHRONIC EXERCISE TRAINING PROTOCOL ON OXIDATIVE STRESS AND RIGHT VENTRICULAR HYPERTROPHY IN MONOCROTALINE-TREATED RATS. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, n. 8, p. 944–948, ago. 2008b.

STARNEs, J. W.; BARNES, B. D.; OLSEN, M. E. Exercise training decreases rat heart mitochondria free radical generation but does not prevent Ca²⁺-induced dysfunction. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 102, n. 5, p. 1793–8, maio 2007.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F. New insights on oxidative stress in the artery wall. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 3, n. 8, p. 1825–34, ago. 2005.

TAKANO, H. et al. Oxidative stress-induced signal transduction pathways in cardiac myocytes: involvement of ROS in heart diseases. **Antioxidants & redox signaling**, v. 5, n. 6, p. 789–794, 2003.

TEICHERT-KULISZEWSKA, K. et al. Biological action of angiotensin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. **Cardiovascular research**, v. 49, n. 3, p. 659–70, 16 fev. 2001.

THURSTON, G. et al. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. **Science (New York, N.Y.)**, v. 286, n. 5449, p. 2511–4, 24 dez. 1999.

URBONIENE, D. et al. Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 299, n. 3, p. L401–L412, 2010.

VAILLANCOURT, M. et al. Adaptation and Remodelling of the Pulmonary Circulation in Pulmonary Hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 31, p. 407–415, 2014.

VAN CRAENENBROECK, E. M. et al. Exercise acutely reverses dysfunction of circulating angiogenic cells in chronic heart failure. **European Heart Journal**, v. 31, n. 15, p. 1924–1934, 2010.

VONK-NOORDEGRAAF, A. et al. Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: Physiology and pathobiology. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 25 SUPPL., p. 22–33, 2013.

WAXMAN, A. B. Exercise physiology and pulmonary arterial hypertension. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 55, n. 2, p. 172–9, jan. .

WHELAN, R. S.; KAPLINSKIY, V.; KITSIS, R. N. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. **Annual review of physiology**, v. 72, p. 19–44, jan. 2010.

YANG, J. et al. Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. **Molecular cell**, v. 9, n. 6, p. 1227–40, jun. 2002.

YASUDA, M. et al. Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells. **Life sciences**, v. 64, n. 4, p. 249–58, jan. 1999.

YU, J. C. et al. Temporal changes of angiopoietins and Tie2 expression in rat lungs after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Comparative Medicine**, v. 59, n. 4, p. 350–356, 2009.

YUN, J. et al. Redox-dependent mechanisms in coronary collateral growth: the “redox window” hypothesis. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 8, p. 1961–74, ago. 2009.

ZHAO, K. et al. Wogonin inhibits LPS-induced tumor angiogenesis via suppressing PI3K/Akt/NF-κB signaling. **European Journal of Pharmacology**, v. 737, p. 57–69, 2014.

ZHOU, Y. et al. Reactive Oxygen Species in Vascular Formation and Development. v. 2013, 2013.

8. ANEXOS

8.1 Aceite do artigo 2 e artigo completo: "Aerobic exercise promotes a decrease in right ventricle apoptotic protein in experimental Cor pulmonale" no Journal of Cardiovascular Pharmacology

Apr 06 2015 09:10:13:269AM

RE: JCVP-14-691R3, entitled "Aerobic exercise promotes a decrease in right ventricle apoptotic proteins in experimental Cor pulmonale"

Dear Dr. Bello-Klein,

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in Journal of Cardiovascular Pharmacology.

All manuscript materials will immediately be forwarded to the production staff for placement in an upcoming issue. You will receive the proof of your article in approximately 6-8 weeks.

OPEN ACCESS

If you indicated in the revision stage that you would like your submission, if accepted, to be made open access, please go directly to step 2. If you have not yet indicated that you would like your accepted article to be open access, please follow the steps below to complete the process:

1. Notify the journal office via email that you would like this article to be available open access. Please send your Email to emily.hurd@wolterskluwer.com. Please include your article title and manuscript number.
2. A License to Publish (LTP) form must be completed for your submission to be made available open access. Please download the form from <http://links.lww.com/LWW-ES/A49>, sign it, and Email the completed form to the journal office.
3. **Within 48 hours of receiving this e-mail:** Go to <http://wolterskluwer.qconnect.com> to pay for open access. You will be asked for the following information. Please enter exactly as shown:
 - a. Article Title - Aerobic exercise promotes a decrease in right ventricle apoptotic proteins in experimental Cor pulmonale
 - b. Manuscript Number - JCVP-14-691R3

Thank you for contributing to Journal of Cardiovascular Pharmacology. We look forward to future submissions.

Kind regards,

Dr. Michael Rosen
Editor-in-Chief
Journal of Cardiovascular Pharmacology
<http://jcvp.edmgr.com/>