

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ANA RAQUEL LEHENBAUER LÜDKE

**AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE SUCO DE UVA EM
MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTENSÃO PULMONAR – PAPEL
DO ÓXIDO NÍTRICO E ESTRESSE OXIDATIVO**

Porto Alegre

2007

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-graduação em Ciências

Biológicas: Fisiologia



**AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE SUCO DE UVA EM
MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTENSÃO PULMONAR – PAPEL
DO ÓXIDO NÍTRICO E ESTRESSE OXIDATIVO**

Ana Raquel Lehenbauer Lüdke

Orientadora: Professora Doutora Adriane Belló-Klein

Co-orientadora: Professora Doutora Wânia Partata

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, do Instituto de Ciências Básica da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Porto Alegre

2007

AGRADECIMENTOS:

Em primeiro lugar agradeço a Deus, grande autor da vida, que me faz olhar para a ciência com os olhos da fé. **“Porque o Senhor dá a sabedoria, e da Sua boca vem a inteligência e o conhecimento” (Provérbios 2.6)**

Também agradeço à minha família, meus grandes amores:

Vitor – meu marido, minha fortaleza em tempos bons e ruins. Sempre disposto e interessado em saber o que eu estava fazendo neste período de mestrado, embora não entendendo muito de fisiologia usava a camiseta “NO OXIDATIVE STRESS” e ainda explicava para seus amigos o que era ESTRESSE OXIDATIVO: “tem a ver com radicais livres”.

Meus pais - Christiane e Mario Lehenbeuer e o Vitinho – Victor F Lehenbauer - pelo suporte vital, pelo amor incondicional que renova minhas forças. **Daniel e Chayenne** que mesmo de longe têm o dom de se fazerem presentes.

Também à **família do Vitor** que me recebe como filha e também valorizou o meu empenho no mestrado.

Ao **pessoal do laboratório** de fisiologia cardiovascular com quem estive durante cinco anos e laboratórios vizinhos que também posso incluir como família, pela ajuda na parte operacional deste trabalho – Tânia, Mariane, Helena, Dai, Paulo, Rafael, Roberta, Alex, Fernanda, Paulo Ricardo, Karina Biavatti, Ana Carolina.

Destaco aqui, algumas pessoas especiais: a **professora Adriane Belló-Klein** (minha orientadora) que abriu meus olhos para a pesquisa e foi fundamental para a realização do trabalho que será lido a seguir, é exemplo de professora, pesquisadora e amiga, a **professora Wânia Partata** que me acolheu de forma carinhosa em seu laboratório, ficou comigo até depois da meia noite fazendo cortes histológicos, a **professora Susana Llesuy** que me recebeu em seu laboratório na Argentina para realizar a análise do suco de uva e foi essencial para novas descobertas, contribuindo para meu aprendizado de forma espetacular e as grandes amigas **Rafaela Caron-Lienert e Chica Mosele** que foram minhas companheiras na execução deste trabalho – mão de obra, sempre junto até o final.

Aos **demais professores** que aguçaram e estimularam a busca pelo conhecimento, onde também destaco a **professora Maria Flávia Ribeiro (Fafá)**, pelo ensino da parte didática e empréstimo do laboratório, professora Matilde Achaval Elena do programa de pós-graduação em neurociências da UFRGS, pelo empréstimo dos aparelhos em seu laboratório e professor Ricardo Ricco do Departamento de fitobotânica de Buenos Aires, pelo ensino da técnica de medida dos polifenóis totais.

Aos **demais amigos** que sabem da complexidade de uma dissertação de mestrado, entendem as olheiras, o cansaço, a falta de tempo para o convívio mais freqüente e aguardam com paciência o retorno à “vida normal”.

“Eu pedi Força...
e Deus me deu dificuldades para me fazer forte.
Eu pedi Sabedoria...
e Deus me deu problemas para resolver.
Eu pedi Prosperidade...
e Deus me deu cérebro e músculo para trabalhar.
Eu pedi Coragem...
e Deus me deu perigo para superar.
Eu pedi Amor...
e Deus me deu pessoas com problemas para ajudar.
Eu pedi Favores... E Deus me deu oportunidades.
Eu não recebi nada do que pedi...
Mas eu recebi tudo de que precisava.”

Autor desconhecido

RESUMO

Administração de monocrotalina (MCT) para desenvolvimento de *Cor pulmonale* é um modelo experimental amplamente utilizado para estudar hipertensão pulmonar e hipertrofia cardíaca seletiva de ventrículo direito. *Cor pulmonale* está associado com estresse oxidativo e disfunção na produção de óxido nítrico (NO). A ingestão de flavonóides, encontrados no suco de uva, tem sido relacionada com a proteção e prevenção de doenças crônicas por seu papel antioxidante. Então, o objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que o aumento do aporte de antioxidantes da dieta pela administração de suco de uva poderia modular a hipertensão pulmonar induzida por MCT, atenuando o estresse oxidativo e interferindo na biodisponibilidade de produção de NO. Ratos Wistar machos recém desmamados foram tratados por seis semanas desde o desmame. Uma única injeção de MCT (60 mg/kg peso corporal i.p.) ou mesmo volume de salina foram administrados na terceira semana do protocolo experimental; água ou suco de uva (10mL/kg/dia) foram administrados durante as 6 semanas por gavagem. Grupos de tratamento (n=6-8/grupo): Controle – recebeu água e injeção de salina, MCT – recebeu água e injeção de MCT, SUCO – recebeu suco de uva e injeção de salina, e S + MCT – recebeu suco de uva e injeção de MCT. Medidas hemodinâmicas foram feitas 21 dias depois da injeção de MCT ou salina para análise da pressão diastólica final de ventrículo direito (PDFVD), pressão sistólica de ventrículo direito (PSVD) e pressão aórtica média (PAM). Depois destas medidas, os ratos foram mortos por deslocamento cervical, morfometria de

coração, fígado e pulmão foram realizadas. Atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST), lipoperoxidação por quimiluminescência, medida de nitritos + nitratos e expressão protéica de eNOS por western blot foram medidos em homogeneizados de pulmão. A atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT e medida de nitritos + nitratos também foram avaliados em sangue. Tecido pulmonar foi preparado para identificação de reação histoquímica de NADPH diaforase. A administração de suco de uva promoveu redução da congestão pulmonar e melhorou a função cardíaca, embora não preveniu a hipertrofia cardíaca de ventrículo direito em ratos tratados com MCT. As enzimas antioxidante SOD, GST e CAT estão aumentadas no grupo MCT, sugerindo a compensação para atenuar o aumento no dano lipídico que também está significativamente aumentado neste grupo. O tratamento com suco de uva minimiza o dano lipídico em pulmão, reduz SOD e mantém alta GST e CAT, sugerindo redução no estresse oxidativo. A administração de suco de uva pôde impedir a queda da expressão protéica de eNOS em tecido pulmonar de ratos tratados com MCT e manteve os metabólitos do NO (nitritos + nitratos) aumentados em plasma, porém diminuídos em tecido pulmonar neste grupo S + MCT, sugerindo que a administração de suco interfere no metabolismo do NO. O suco de uva mostrou ter potencial preventivo e terapêutico para manejo da hipertensão pulmonar.

Palavras-chave: suco de uva, monocrotalina, *Cor pulmonale*, estresse oxidativo, óxido nítrico

ABSTRACT

Administration of monocrotaline (MCT) for development of *Cor pulmonale* is an experimental model widely applied to study pulmonary hypertension and selective right ventricular hypertrophy. *Cor pulmonale* is associated with oxidative stress and NO impairment. The ingestion of polyphenolic compounds, found in grape juice (GJ), has been related to chronic diseases protection for its antioxidant role. Thus, this study tested the hypothesis that supplementation of antioxidants on diet by means GJ administration could modulate pulmonary hypertension induced by MCT in terms of oxidative stress and NO bioavailability expression impairment. Just-weaned male Wistar rats were treated during 6 weeks since weaning. A single injection of MCT (60 mg/kg body weight i.p.) or equal volume of saline was administered in the third week of experimental protocol, water or GJ (10mL/kg/day) were administered throughout the protocol by gavage. Groups of treatment (n=6-8/group): Control – received water and saline injection, MCT – received water and MCT injection, JUICE – received GJ and saline injection, and J + MCT) – received GJ and MCT injection. Animals were assessed hemodynamically 21 days after MCT or saline injection to recording right ventricular end diastolic pressure (RVEDP), right ventricular systolic pressure (RVSP) and mean arterial pressure. After cervical dislocation, heart and lung morphometry was performed. Antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST), lipid peroxidation (LPO) by chemiluminescence (CL), NO metabolites (nitrites + nitrates) and western blot analysis of eNOS protein expression were measured in lung homogenates. Lung

tissue was prepared to identification of NADPH diaphorase histochemistry reaction. Antioxidant enzyme activities SOD and CAT, and nitrites + nitrates were also measured in blood. Administration of GJ promoted a reduction in pulmonary congestion and improvement in cardiac function, whereas did not prevent right ventricular hypertrophy in MCT treated rats. Antioxidant enzymes SOD, CAT and GST were found to be increased in lung of MCT group probably to compensate lipid oxidative damage which is also significantly enhanced, while grape juice minimizes lipid damage to lungs, promote low levels of SOD and augmentation in CAT and GST suggesting a reduction on oxidative stress, the profile was the same in both groups: JUICE and J + MCT. Grape juice treatment could inhibit the impairment of lung eNOS protein expression in MCT treated rats and could also maintain NO metabolites elevated in plasma, but decreased in lung tissue, suggesting that GJ administration modulate NO metabolism. Grape juice may prove to be preventive and therapeutic potential to pulmonary hypertension management.

Keywords: grape juice, monocrotaline, *Cor pulmonale*, oxidative stress, nitric oxide

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABAP - 2,2-azo-bis (2-amidinopropano) hidrocloreto
- ABTS - ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico)
- ANOVA - análise de variância
- CAT - enzima catalase
- CNDB - cloro-dinitro-benzeno
- DNP-SG - dinitro-fenil-glutathiona
- DPOC - doença pulmonar obstrutiva crônica
- DPPH - difenil-1-picrilhidrazil
- EDHF - fator hiperpolarizante derivado do endotélio
- eNOS - óxido nítrico sintase endotelial
- ERO - espécies reativas de oxigênio
- G6P - glicose 6-fosfato
- G6PDH - Glicose 6-fosfato desidrogenase
- GMPc - guanosina monofosfato cíclica
- GSH - glutathiona reduzida
- GST - enzima glutathiona-S-transferase
- ICC - insuficiência cardíaca congestiva

iNOS - óxido nítrico sintase induzível

i.p. - intraperitoneal

LPO - lipoperoxidação

MCT - monocrotalina

NADPH-d - NADPH-diaforase

nNOS - óxido nítrico sintase neuronal

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintase

NR - nitrato redutase

p/v - peso/volume

PAM - pressão aórtica média

PDFVD - pressão diastólica final de ventrículo direito

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonila

PSVD - pressão sistólica de ventrículo direito

QL - quimiluminescência

SDS - dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida

SOD - enzima superóxido dismutase

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

tBOOH - hidroperóxido de tert-butil

TP - tampão fosfato

VD - ventrículo direito

VE - ventrículo esquerdo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Causas de hipertensão pulmonar e *Cor pulmonale*

Tabela 2. Composição nutricional do suco de uva 100% natural presente no rótulo do produto

Tabela 3. Parâmetros morfométricos e hemodinâmicos de ratos submetidos ao tratamento

Tabela 4. Parâmetros de estresse oxidativo em homogeneizado de tecido pulmonar de ratos submetidos ao tratamento

Tabela 5. Quadro comparativo entre o grupo de ratos MCT e S + MCT

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografia de arteríola pré-acinar de rato com hipertrofia da túnica média

Figura 2. Vasorelaxamento dependente do endotélio

Figura 3 – Estrutura Básica dos Polifenóis

Figura 4. Formação de espécies ativas de oxigênio a partir do oxigênio molecular

Figura 5. Desenho experimental do estudo

Figura 6. Variação na % de inibição da lipoperoxidação avaliada por TBARS (em homogeneizado de fígado de rato não submetido a tratamento algum) avaliando-se diferentes volumes de suco adicionado

Figura 7. Variação na % de inibição da lipoperoxidação avaliada por QL (em homogeneizado de cérebro de rato não submetido a tratamento algum) avaliando-se diferentes volumes de suco adicionado

Figura 8 – Reação histoquímica de NADPH diaforase em vasculatura de pulmão de ratos submetidos ao tratamento

Figura 9 – Fotomicrografia de arteríola pré-acinar de rato do grupo MCT, com hipertrofia da túnica média – representada à esquerda e arteríola de rato do grupo CONTROLE, sem hipertrofia da camada muscular – representada à direita. Coloração de hematoxilina/eosina.

Figura 10 – Reação histoquímica de NADPH diaforase nas vias aéreas – broquíolos - de pulmão de ratos submetidos ao tratamento

Figura 11: Análise de Western blot em homogeneizados de pulmão utilizando como anticorpo e-NOS

Figura 12: Concentração de nitritos+nitratos em homogeneizados de pulmão

Figura 13: Concentração de nitritos+nitratos em plasma

Figura 14: Concentração de nitritos+nitratos em plasma ao final de cada semana após ter recebido injeção de salina ou MCT

Figura 15: Atividade da catalase (CAT) em eritrócitos ao final de cada semana após ter recebido injeção de salina ou MCT

Figura 16: Atividade da superóxido dismutase (SOD) em eritrócitos ao final de cada semana após ter recebido injeção de salina ou MCT

Figura 17. Esquema geral de produção de espécies ativas de oxigênio e metabolização pela SOD = superóxido dismutase e CAT = catalase

Figura 18: Representação esquemática da reação da LPO

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 A Hipertensão pulmonar e o Cor pulmonale	18
1.2 Papel do óxido nítrico na hipertensão pulmonar	23
1.3 Proposta preventiva e terapêutica: o suco de uva	26
1.4 Os componentes polifenólicos da uva	28
1.5 Entendendo o processo de atuação do antioxidante	30
2. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS	34
4. METODOLOGIA	36
4.1 Protocolo Experimental	36
4.2 Grupos experimentais	37
4.3 Seqüência Experimental	38
4.4 Desenho Experimental	39
4.5 Suco de uva	40
4.5.1 Avaliação dos polifenóis totais.....	40
4.5.2 Avaliação da capacidade antioxidante por ABTS	41
4.5.3 Avaliação da capacidade antioxidante por DPPH	42
4.5.4 Avaliação da capacidade antioxidante do suco por TBARS	42
4.5.5 Avaliação da capacidade antioxidante do suco por QL	43
4.6 Indução da Hipertensão Pulmonar e Preparação do Sangue	44
4.7 Avaliação hemodinâmica	45
4.8 Medidas Morfométricas e Preparação de Homogeneizados.....	45
4.9 Reação histoquímica à NADPH diaforase	46
4.10 Expressão da eNOS por Western Blot	48
4.11 Determinação de Nitratos e Nitritos	49
4.12 Dosagem de dano a lipídios	50

4.13 Dosagem da Atividade das Enzimas Antioxidantes	51
4.13.1 Catalase (CAT)	51
4.13.2 Superóxido dismutase (SOD)	51
4.13.3 Glutathione-S-Transferase (GST)	52
4.14 Quantificação das proteínas - Método de Lowry	53
4.15 Análise estatística	54
5. RESULTADOS	55
5.1 Avaliação do suco de uva	55
5.1.1 Quantidade de polifenóis totais, ABTS e DPPH do suco	55
5.1.2 Avaliação da capacidade antioxidante do suco por TBARS	56
5.1.3 Avaliação da capacidade antioxidante do suco por QL	57
5.2 Crescimento dos animais	58
5.3 Avaliação morfométrica e hemodinâmica	59
5.3.1 Avaliação morfométrica de coração – Hipertrofia cardíaca	59
5.3.2 Avaliação morfométrica de pulmão – Congestão pulmonar	60
5.3.3 Avaliação Pressão Diastólica Final de Ventrículo Direito (PDFVD).....	60
5.3.4 Avaliação Pressão Sistólica do Ventrículo Direito (PSVD)	61
5.5 Reação histoquímica à NADPH diaforase	63
5.6 Expressão da eNOS por Western Blot	65
5.7 Concentração de Nitratos e Nitritos	66
5.8 Dosagem de dano a lipídios e Atividade das Enzimas Antioxidantes.....	69
5.8.1 Lipoperoxidação por quimiluminescência	69
5.8.2 Atividade das enzimas antioxidantes	70
6. DISCUSSÃO	73
7. CONCLUSÃO	86
8. PERSPECTIVAS	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
APÊNDICE – ARTIGO A SER SUBMETIDO	105

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Hipertensão pulmonar e o *Cor pulmonale*

A hipertensão pulmonar é caracterizada por obstrução pré-acinar de artérias pulmonares, com conseqüente aumento sustentado da pressão arterial pulmonar média (> 25 mmHg em repouso ou > 30mmHg durante exercício) (Rubin, 1993). Sua etiologia é imprecisa, sendo que os achados histológicos revelam proliferação de células endoteliais e musculares lisas das artérias levando a um remodelamento vascular pulmonar (Rubin, 2004).

Já o termo *Cor pulmonale* foi definido pela Organização Mundial de Saúde como uma síndrome, caracterizada pela hipertrofia do ventrículo direito, resultante de doenças que afetam a função e/ou a estrutura dos pulmões, como é o caso da hipertensão pulmonar, exceto quando as alterações pulmonares são secundárias a doenças que afetam o lado esquerdo do coração ou a cardiopatias congênitas (WHO, 1963). Frente ao limitado uso clínico desta definição, por basear-se em um

aspecto anatomopatológico, Behnke et al. (1970) o redefiniram, substituindo o termo hipertrofia por alteração na estrutura e função do ventrículo direito. Essa definição que persiste ainda é imprecisa, pois engloba desde um comprometimento leve à franca falência do ventrículo direito.

A hipertensão pulmonar é um achado freqüente sendo conseqüência de uma série de doenças (Rich, 1998) (Tabela 1).

<p>Causas de hipertensão pulmonar e <i>Cor pulmonale</i></p> <p>1. Doenças alveolares e de vias aéreas</p> <ul style="list-style-type: none"> - DPOC - Fibrose Cística - Doenças infiltrativas e granulomatosas Sarcoidose Fibrose pulmonar idiopática Colagenoses Radiação Pneumoconiose - Obstrução de vias aéreas superiores - Pneumopatia secundária a alta altitude - Pneumopatias congênitas (fístula arteriovenosa) <p>2. Doenças da caixa torácica</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cifoescoliose - Doença neuromuscular - Síndrome da apnéia do sono - Hipoventilação idiopática - Fibrose pleural <p>3. Doenças vasculares do pulmão</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hipertensão pulmonar primária - Arterite pulmonar granulomatosa (Sarcoidose, Esquistossomose) - Induzida por drogas Anorexígenos Cocaína L-Triptofano - Anemia falciforme - Tromboembolismo pulmonar - Vasculites - Doença pulmonar venoclusiva <p>4. Compressão vascular pulmonar extrínseca</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tumores mediastinais - Aneurismas - Granulomatose - Fibrose mediastinal

Tabela 1. Causas de hipertensão pulmonar e *cor pulmonale* (OTA JS & PEREIRA CAC. *Cor pulmonale*. Medicina, Ribeirão Preto, 31: 241-246, abr./jun. 1998).

Estima-se que a incidência anual da hipertensão pulmonar idiopática ou familiar na população geral seja em torno de um a dois casos por milhão. Grande parte dos dados epidemiológicos existentes foi obtida no Registro Nacional, realizado nos EUA e publicado em 1987. Esse estudo reuniu os subgrupos: hipertensão pulmonar idiopática, hipertensão arterial pulmonar familiar e hipertensão arterial pulmonar relacionada ao uso de anorexígenos (Rich et al, 1987). Considerados os três diagnósticos, a incidência é maior em mulheres. Compromete predominantemente indivíduos jovens. Entre as mulheres a prevalência é maior na terceira década e entre os homens na quarta década de vida. Não há predomínio racial. Cinco por cento dos pacientes que participaram do Registro Nacional norte-americano tinham usado anorexígenos no passado e 6% tinham história familiar de hipertensão arterial pulmonar (Rich et al, 1987). Mais recentemente, o caráter familiar foi relacionado a mutações no gene BMPRII (D'Alonzo et al, 1991; Machado et al, 2001).

A presença de hipertensão pulmonar com *Cor pulmonale* geralmente está associada a um pior prognóstico, independentemente da doença de base. A sobrevida estimada, na presença de *Cor pulmonale*, é de 45% em dois anos, contra 69% na sua ausência (Macnee, 1992; Rezentti et al, 1996). A sobrevida média dos pacientes com hipertensão pulmonar, antes do surgimento e uso rotineiro das novas drogas disponíveis para tratar a doença, era de 2,8 anos após o diagnóstico (Rich et al, 2000).

Modelos experimentais de hipertensão pulmonar têm sido criados e caracterizados para estudar e entender seus mecanismos. Pesquisas realizadas têm o intuito de prevenção e tratamento das manifestações clínicas que culminam com a insuficiência cardíaca, pois esta doença permanece sendo responsável por um alto

índice de morbidade e mortalidade da população mundial. Entre os modelos experimentais de hipertensão pulmonar, amplamente utilizado, é o modelo da monocrotalina (MCT) que produz hipertensão pulmonar, seguida de sobrecarga de pressão no ventrículo direito, hipertrofia ventricular direita e, eventualmente, insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (Pan et al, 1993).

Entre os casos de insuficiência cardíaca, 30% estão relacionados à falência do ventrículo direito (VD), sendo que esta situação é a principal causa de morbidade e mortalidade pós-transplante cardíaco (Lovoulos et al, 2004).

A MCT começou a ser estudada por vários autores que avaliaram o dano cardíaco e pulmonar. Pan et al (1993) estudaram hipertrofia do ventrículo direito, e insuficiência cardíaca congestiva. Uma única injeção intraperitoneal (60-90 mg/kg) de MCT em ratos produz, nas 2 ou 3 semanas subseqüentes, características clínicas que se assemelham à hipertensão pulmonar idiopática em humanos (Kay et al, 1982; Rodeheffer, 1992; Jasmin et al, 2003).

A utilização desse modelo experimental de *Cor Pulmonale* induzido por uma única injeção de MCT é ideal, pois mimetiza os sintomas encontrados na hipertensão pulmonar primária em humanos sem precisar de intervenções cirúrgicas (Comini, 1996).

A MCT é um alcalóide pirrolizidina presente em uma variedade de plantas, como nas sementes de *Crotalaria spectabilis* (Comini, 1996). A sua toxicidade é caracterizada pela bioativação hepática a um alcalóide pirrol tóxico, a dehidromonocrotalina, que é subseqüentemente transportado para os pulmões, sendo capaz de induzir uma resposta citotóxica. Além disso, ela causa mudanças megalocíticas nas células endoteliais pulmonares, as quais geram ativação prolongada do remodelamento vascular, hipertensão pulmonar e conseqüente

insuficiência cardíaca direita (Todorovich-Hunter et al, 1992; Yan & Huxtable, 1996; Cheng, 2005).

Como vários estudos sugerem que a vasoconstrição pulmonar é um dos mecanismos envolvidos na patogenia da hipertensão pulmonar, com hipertrofia da camada média (Figura 1), diminuição da produção de vasodilatadores pelo endotélio pulmonar (prostaciclina e óxido nítrico) e aumento da produção de vasoconstritores (endotelina), a utilização de substâncias com ação sobre a circulação pulmonar é base para o tratamento da doença (Archer & Rich, 2000). Modelos experimentais de hipertensão pulmonar têm mostrado que a prevenção ou reversão do aumento da pressão nas artérias pulmonares está associada com a restauração da atividade da óxido nítrico sintase (NOS) (Campbell et al, 1999; 2001).

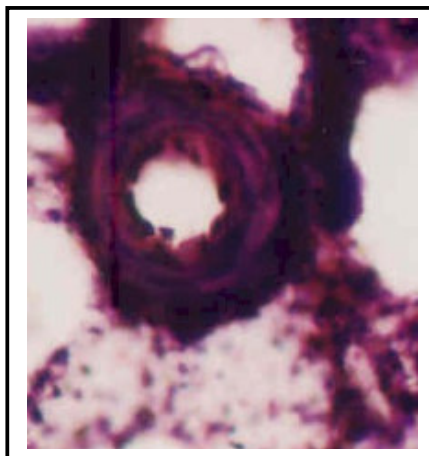


Figura 1. Fotomicrografia de arteríola pré-acinar de rato com hipertrofia da túnica média. Coloração de hematoxilina/eosina. Objetiva 10x. Dado produzido neste estudo

O pulmão *per se* é predisposto ao estresse oxidativo, uma vez que o nível relativamente alto de O_2 facilita a produção de espécies ativas de oxigênio. O estresse oxidativo pulmonar está envolvido em muitas condições patológicas

incluindo: hiperóxia, isquemia/reperfusão, sepse, injúria radioativa, transplante de pulmão, doença pulmonar obstrutiva crônica e inflamação (Christofidou-Solomidou & Muzykantov, 2006). Além disso, já foi demonstrado o envolvimento de espécies ativas de oxigênio na hipertensão pulmonar, hipertrofia de ventrículo direito e insuficiência cardíaca por MCT (Farahmand et al, 2004).

O modelo de MCT permite o avanço na compreensão dos mecanismos ligados à doença que ainda não estão bem elucidados bem como definir estratégias terapêuticas para a mesma.

1.2 Papel do óxido nítrico na hipertensão pulmonar

Para entender o papel do óxido nítrico na hipertensão pulmonar faz-se necessário antes o conhecimento básico sobre sua bioquímica e fisiologia. O óxido nítrico é uma molécula gasosa que contém um elétron desemparelhado, é extremamente lipofílico e prontamente se difunde pelas membranas plasmáticas conforme o gradiente de concentração. Em função de sua estrutura química, o elétron desemparelhado confere reatividade com outras moléculas, o que leva a muitos e diferentes efeitos biológicos. Por exemplo, o óxido nítrico reage com o ferro de heme-proteínas ou com o ferro de proteínas sulfuradas, modulando assim a atividade de enzimas intracelulares críticas. O exemplo mais conhecido dessas reações envolve a difusão do óxido nítrico de células vasculares endoteliais para células da musculatura lisa vascular, onde o óxido nítrico reage com o ferro de grupamentos heme da guanilato ciclase solúvel, alterando sua conformação e ativando a enzima. A guanilato ciclase ativa produz guanosina monofosfato cíclica

(GMPc), promovendo o relaxamento dessas células musculares lisas da vasculatura (figura 2) (Hart, 1999).

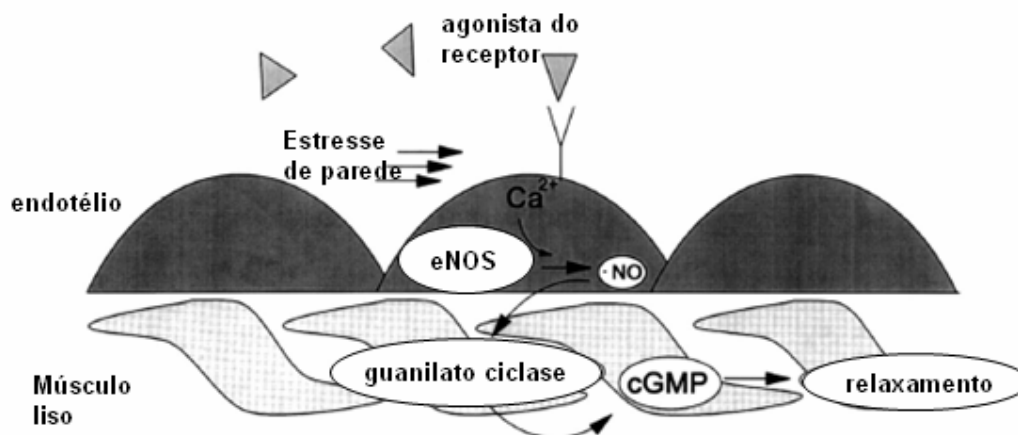


Figura 2. Vasorelaxamento dependente do endotélio. Estímulo intravascular (agonista de receptor ou estresse de parede, por exemplo) causando elevações transitórias na concentração intracelular de Ca^{+2} na célula endotelial. Este Ca^{+2} ativa a eNOS, que produz óxido nítrico (NO). NO é difundido para a camada de músculo liso adjacente onde estimula a guanilato ciclase a aumentar a produção de cGMP, promovendo vasorelaxamento. Adaptado de Hart, 1999

Esses eventos bioquímicos promovem os potentes efeitos vasodilatadores do óxido nítrico e desencadeiam os mecanismos de sinalização para estímulo da modulação do tônus vascular e do fluxo sanguíneo (Coggins & Bloch, 2007).

O óxido nítrico também participa de muitas outras reações biologicamente importantes. Em solução, ele reage com oxigênio para formar os metabólitos inativos – nitrato e nitrito. No estado gasoso, ele reage com o oxigênio para formar dióxido de nitrogênio (NO_2), um gás tóxico que se forma proporcionalmente às concentrações de óxido nítrico e oxigênio. O óxido nítrico também pode reagir rapidamente com o oxigênio do radical superóxido para formar peroxinitrito ($ONOO^-$),

uma potente espécie oxidante que pode levar a dano tecidual em síndromes agudas pulmonares (Hart, 1999).

O que deve ser enfatizado é que as interações com o óxido nítrico, seus metabólitos e outros radicais mediadores são muito complexas. Por exemplo, embora o óxido nítrico se combine com superóxido para formar ONOO^- , iniciador de lipoperoxidação, ele também se combina com peróxido formado a partir de lipídios para inibir a lipoperoxidação. Os efeitos pró ou antioxidantes do óxido nítrico são determinados não apenas pela concentração do mesmo, como também pelas concentrações e taxas relativas de outros radicais livres mediadores desses eventos (Hart, 1999).

As enzimas responsáveis pela produção de óxido nítrico, a partir do aminoácido arginina gerando citrulina como produto, são as óxido nítrico sintases (NOS). Três isoformas diferentes já foram identificadas: NOS neuronal - nNOS, por sua expressão predominante em tecidos neuronais; NOS induzível - iNOS, por sua expressão ser aumentada quando há necessidade de resposta inflamatória; e NOS endotelial - eNOS, originalmente isolada do endotélio (Coggins & Bloch, 2007).

Existem evidências que indicam que a expressão das isoformas constitutivas das NOS (nNOS e eNOS) e a produção intravascular de óxido nítrico participa da regulação da reatividade vascular pulmonar em pulmões saudáveis. E ainda, que o óxido nítrico desempenha um papel chave na regulação de eventos vasculares, nas vias aéreas e processos inflamatórios. Em contraste, a produção deficiente deste gás na vasculatura pulmonar está associada com a hipertensão pulmonar (Hart, 1999).

A expressão diminuída de NOS no endotélio da vasculatura pulmonar de pacientes com hipertensão pulmonar primária e secundária sugere que a atenuação

sustentada da produção de óxido nítrico está associada com alterações significantes no tônus vascular (Giad & Saleh, 1995). As evidências sugerem que a alteração na produção de óxido nítrico a partir da eNOS desempenha papel importante na patogênese da hipertensão pulmonar.

1.3 Proposta preventiva e terapêutica: o suco de uva

Compostos polifenólicos, presentes em grande quantidade no vinho e suco de uva preta, possuem efeitos benéficos sobre muitas doenças, incluindo o câncer, doenças cardiovasculares e desordens neurodegenerativas (Willians, 2004; González-Gallego et al, 2007).

Diversos estudos epidemiológicos têm mostrado que o consumo de alimentos ricos em compostos polifenólicos está associado com a baixa incidência de doenças cardiovasculares (Zenebe, 2003), e este fenômeno se mostra correlacionado em parte a sua capacidade antioxidante e habilidade de diminuir o estresse oxidativo (Rice-Evans et al, 1996; Wang & Huang, 2005). Além de seus efeitos hipotensores, *in vitro*, os compostos flavonóides induzem a vasodilatação dependente do endotélio de anéis arteriais, um fenômeno mediado pela óxido nítrico guanosina 3'5' monofosfato (NO-cGMP) (Stein, 1999; Zenebe, 2003) e induzem o aumento da expressão e atividade da NOS endotelial (eNOS), modulando a produção de NO (Wallerath, 2002; Rathel et al, 2007).

Os efeitos benéficos do vinho para a saúde já eram conhecidos na Antigüidade, quando participava das formulações de Hipócrates e de Galeno. As legiões romanas que dominaram todo mundo antigo por um milênio, usavam vinho em suas compressas para os ferimentos de guerra (Paula Santos, 2002).

Pesquisas quanto aos benefícios cardiovasculares foram intensificadas após o estudo de Renaud & De Lorgeril (1992) para a Organização Mundial de Saúde que evidenciou que a incidência de doenças cardiovasculares era menor na França do que em outros países industrializados, apesar de naquele país os fatores de risco (consumo de gordura saturada, nível de colesterol sérico, pressão arterial, índice de massa corporal, tabagismo e sedentarismo) não serem menores. Creditou-se ao vinho o menor índice de doença cardiovascular.

Esse fato foi designado pelos autores como o "paradoxo francês". Logo criticado por outros autores na mesma revista (Gurr, 1992; Segall, 1992; Barnard & Linter, 1992; Macnair, 1992; Nestle, 1992), ganhou fama mundial com a imprensa. Como cita Paula Santos (1992), a divulgação do "paradoxo" em programa de alta audiência (21 milhões de espectadores) na TV americana teve tanta repercussão que as vendas de vinho nos EUA aumentaram 44% nas quatro semanas seguintes à apresentação do programa.

Aqui esbarramos em um grave e crescente problema de saúde pública, com o aumento no consumo de vinho também há aumento do alcoolismo. Isto se torna mais sério quando se trata de doenças que comprometem predominantemente indivíduos jovens como a hipertensão pulmonar seguida de *Cor pulmonale*, por exemplo. Assim, o suco de uva poderia ser uma proposta não farmacológica preventiva e terapêutica alternativa, eliminando os efeitos deletérios do álcool e podendo ser administrado também a crianças.

Esta proposta foi utilizada neste estudo, sendo que alguns estudos já demonstraram os benefícios quanto ao consumo de suco de uva. Mostrou-se que o suco de uva é rica fonte de flavonóides antioxidantes catequina, epicatequina,

quercetina, a antocianinas (Rice-Evans et al, 1996). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que o suco de uva possui atividade antioxidante, inibindo a oxidação do LDL, por exemplo (Durak et al. 1999; O'Byrne et al, 2002). Takahara (2005) relata que uma única dose (3 mL/kg) de administração oral de uma bebida com grande quantidade de polifenóis da uva e sem álcool exerce efeito hipotensor e bradicárdico em humanos assim como em modelo animal (Takahara, 2005). Os componentes polifenólicos da uva são potentes vasodilatadores, ativando vias de sinalização intracelular que levam ao aumento na produção de NO (Anselm et al, 2007).

1.4 Os componentes polifenólicos da uva

A estrutura química dos polifenóis é fundamental para suas propriedades biológicas: atividade antioxidante, interações específicas com os receptores celulares e sua biodisponibilidade, entre outras propriedades (Williams et al, 2004). Os polifenóis apresentam mais de um anel aromático com cada um contendo pelo menos um grupo hidroxil, que lhes confere propriedade antioxidante (Noroozi et al, 1998) (figura 3). Estudos demonstram que a função antioxidante dos flavonóides encontra-se na habilidade dos mesmos de atuarem como varredores de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e, em alguns casos, quelando metais de transição dependendo de sua estrutura. A propriedade antioxidante é conferida em virtude do número e arranjo de seus anéis fenólicos contendo grupamentos hidroxílicos. Sua habilidade de agir como antioxidante pela doação de um elétron a um agente oxidante depende do potencial de redução de seus radicais e da acessibilidade do radical. Por exemplo, flavonóides são potentes seqüestradores de radicais peroxil

devido à favorável redução a radicais peroxil alquil, sendo assim, potenciais inibidores da lipoperoxidação (Rice-Evans, 2001).

A principal estrutura dos flavonóides que determina potente papel redutor é a presença de um catecol (3,4 - dihidroxil) no anel B – quando em lugar de R1 há um grupo hidroxil; uma 2,3-dupla ligação insaturada e um grupamento 3-hidroxil (em lugar de x) no anel C também podem contribuir eficientemente para a doação de um elétron (figura 3).

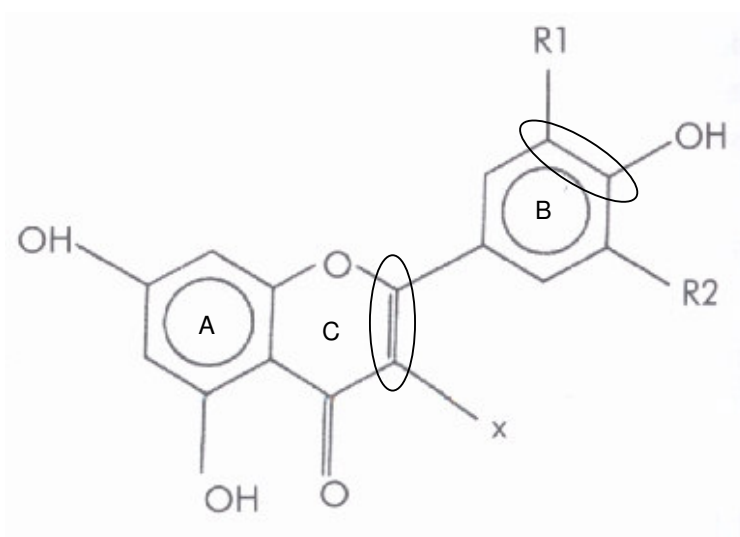


Figura 3 – Estrutura Básica dos Polifenóis (Rice-Evans et al., 1997)

1.5 Entendendo o processo de atuação do antioxidante

Durante o curso do metabolismo celular, a molécula de oxigênio passa por um processo de redução completa até água. Entretanto, uma pequena parte (3-5%) é convertida a produtos reduzidos, tais como: o peróxido de hidrogênio, o ânion superóxido e o radical hidroxil, também chamados de espécies reativas de oxigênio – ERO (Halliwell & Gutteridge, 1990), como pode ser observado na Figura 4.

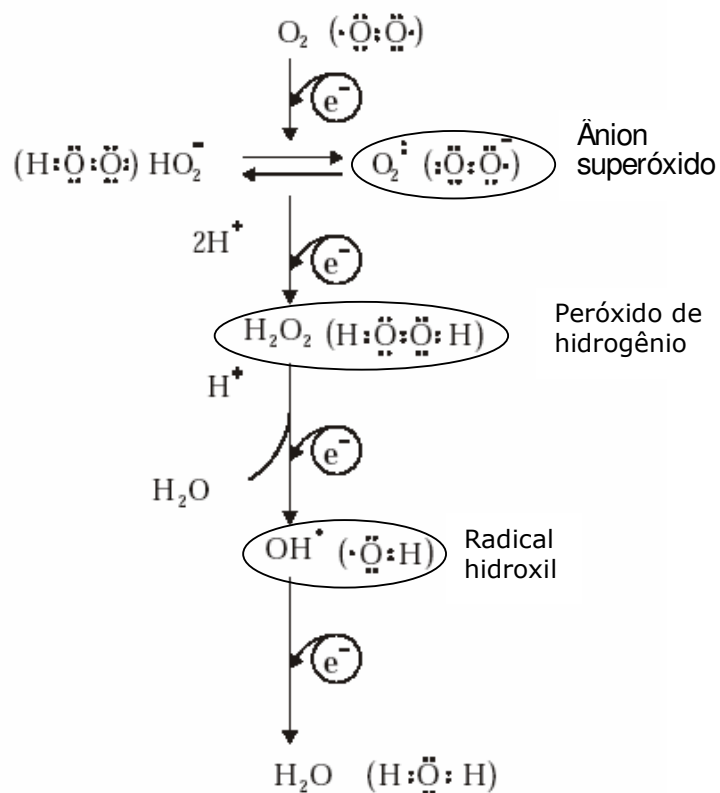


Figura 4. Formação de espécies ativas de oxigênio a partir do oxigênio molecular (Adaptado de MARKS et al., 1996)

Há substâncias que possuem o potencial de neutralizar as ações dos radicais livres, prevenindo, desta forma, os danos oxidativos. Esse grupo é chamado de antioxidantes. Os antioxidantes são encarregados de manter baixas as concentrações de espécies reativas de oxigênio (ERO). Atuam prevenindo a formação dessas espécies ou combatendo-as uma vez que tenham sido formadas (Repetto & Llesuy, 2002).

Seus mecanismos de ação são diversos, podendo incluir remoção do oxigênio presente no meio, atuar como *scavengers*, “varrendo” as ERO ou seus precursores, inibição da formação das ERO, quelação de metais que catalisam sua formação, indução de aumento da geração de antioxidantes endógenos, entre outros mecanismos, envolvendo muitas vezes integração funcional de vários destes componentes (Halliwell & Gutteridge, 1999).

O termo “estresse oxidativo” é usado para se referir à situação de desequilíbrio entre a produção de oxidantes e a defesa antioxidante. O estresse oxidativo pode resultar de uma diminuição das defesas antioxidantes e/ou de uma produção aumentada de oxidantes (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Para proteger as células contra o ataque das ERO em situação de estresse oxidativo, e mesmo habitualmente evitando essa situação, o organismo possui um sistema fisiológico de defesa antioxidante é dividido em: enzimático através das enzimas: superóxido dismutase - SOD, catalase – CAT (o peróxido de hidrogênio, formado na dismutação do ânion radical superóxido pela SOD, é transformado em água e oxigênio por ação da CAT), peroxidases, entre outras e não-enzimático incluindo proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes, proteínas que protegem biomoléculas contra dano por outros mecanismos, substâncias de baixo

peso molecular tais como glutathiona, α -tocoferol, ácido úrico, bilirrubina e outros que combatem ERO e de espécies ativas de nitrogênio, e ainda antioxidantes de baixo peso molecular provenientes da dieta, como os compostos polifenólicos em questão (Halliwell & Gutteridge, 1999).

O sistema enzimático é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. Existem, também, as defesas secundárias que impedem a propagação da LPO e as terciárias, enzimas de reparo de danos já instalados (Yu, 1994).

O antioxidante, quando presente em baixas concentrações, comparadas com aquelas do substrato passível de ser oxidado, retarda ou evita de forma significativa à oxidação desse substrato (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Estando as ERO em altas concentrações, há dano em diferentes estruturas celulares, tais como: lipídeos, proteínas ou DNA. Esse prejuízo pode ser responsável pelo efeito deletério de certas doenças tais como: câncer, infarto agudo do miocárdio, doenças inflamatórias, doenças degenerativas e em certas doenças sangüíneas (Halliwell & Gutteridge, 1990).

2. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA

A hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina está relacionada ao aumento do estresse oxidativo e redução da síntese de NO. A administração de suco de uva, garantindo rica fonte de componentes fenólicos, atenua a hipertensão pulmonar por modular estes fatores.

Considerando o aspecto de que espécies ativas de oxigênio possuem uma íntima relação com doenças como a hipertensão pulmonar onde há também déficit de NO e que há consideráveis evidências de que flavonóides, presentes no suco de uva, atuam eficientemente no papel de atenuar o efeito de radicais livres além de terem efeito vasodilatador essencial no tratamento da hipertensão pulmonar, esse trabalho visa contribuir para a comprovação do efeito antioxidante e vasodilatador do suco em tecido pulmonar, foco da doença, sendo nossa proposta dietética para prevenção e tratamento neste modelo experimental.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

Determinar a concentração de polifenóis totais e capacidade antioxidante do suco de uva integral *in vitro* e a administração do mesmo na modulação do estresse oxidativo e da produção de óxido nítrico na hipertensão pulmonar induzida por MCT, avaliando parâmetros sistêmicos e em tecido pulmonar neste modelo experimental.

Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* e em tecido biológico do suco de uva empregado no estudo e quantificar os polifenóis totais do mesmo
- Acompanhar curva de crescimento e avaliação da composição corporal através do índice de Lee
- Avaliar medidas hemodinâmicas (PDFVD, PSVD e PAM) e morfométricas de coração, fígado e pulmão
- Avaliar reação histoquímica à NADPH diaforase em tecido pulmonar;
- Quantificar a expressão da eNOS por Western Blot em homogeneizado de tecido pulmonar
- Quantificar os metabólitos do NO (Nitritos + Nitratos) em homogeneizado de tecido pulmonar e em plasma na primeira, segunda e terceira semanas após a injeção de MCT ou salina;
- Medir a lipoperoxidação por QL em homogeneizados de tecido pulmonar;
- Medir atividade das enzimas CAT, SOD e GST em homogeneizados de tecido pulmonar e medir a atividade de CAT e SOD em eritrócitos na primeira, segunda e terceira semanas após a injeção de MCT ou salina;

4. METODOLOGIA

4.1 Protocolo Experimental

Foram utilizados ratos machos Wistar recém desmamados (21 dias de idade), pesando entre 47 a 51 g, adquiridos do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os animais recém desmamados (21^o dia de vida) foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais, agrupados em caixas plásticas com medidas de 270 x 260 x 310 mm, sendo quatro animais por caixa. O número final de ratos utilizados foi de 44 animais, sendo 16 para análises histoquímicas (n=4/grupo) e o restante para as demais análises (n=8 nos grupos com injeção de salina e n=6 nos grupos com injeção de MCT). Como constatado em outros trabalhos realizados em nosso departamento, o número necessário de animais para que façamos análise estatística adequada ao final dos experimentos é de no mínimo 6 animais por grupo para análises hemodinâmicas, morfométricas e bioquímicas (Irigoyen et al, 2005) e 4 animais por grupo para a medida imunohistoquímica (Malcon et al, 1998).

Durante todo tratamento, os animais tiveram acesso à água e ração (Guabi – Indústria de alimentos Alisul Ltda) “ad libitum”. A temperatura ambiente foi em média

22°C com controle cíclico de 12 horas luz/escurecimento e umidade relativa de 70%. A quantidade de água e suco de uva administrada por sonda intragástrica foi de 10 mL/kg peso, uma vez ao dia, diariamente, desde o desmame até o final da 6ª semana tratamento (Osman et al, 1998). A indução da hipertensão pulmonar para gerar insuficiência cardíaca direita ocorreu na 3ª semana de tratamento (21 dias), através de uma única injeção intraperitoneal de MCT (60mg/kg de peso corporal). Após, permaneceram por mais 3 semanas (21 dias) em tratamento, sendo pesados semanalmente para acompanhamento do crescimento e para determinação do Índice de Lee. Esta medida foi obtida através do peso corporal do rato pelo seu comprimento e mensura a distribuição da sua massa corporal (Bernardis & Patterson, 1968). O tratamento encerrou-se na 9ª semana de vida dos animais, ao final da 6ª semana de experimento.

Os procedimentos experimentais realizados nos animais foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (Projeto nº 2006666), obedecendo às normas estabelecidas pelo mesmo que foi criado em março de 1997 (Goldim & Raymundo, 1997).

4.2 Grupos experimentais

Foram estabelecidos 4 grupos experimentais:

CONTROLE → sem hipertensão pulmonar, que recebeu água via intragástrica durante todo período experimental.

MCT → com hipertensão pulmonar por MCT, que recebeu água via intragástrica durante todo período experimental.

SUCO → sem hipertensão pulmonar, que recebeu suco de uva via intragástrica durante todo o período experimental.

S + MCT → com hipertensão pulmonar por MCT, que recebeu suco de uva via intragástrica durante todo o período experimental.

4.3 Seqüência Experimental

1) A administração de suco de uva ou água iniciou na terceira semana de vida dos animais, logo após o desmame;

2) A indução da hipertensão pulmonar (ou grupo controle do mesmo) foi realizada na 6^a semana de vida por única injeção de MCT (60mg/kg i.p.) ou mesmo volume de salina;

3) A morte dos animais ocorreu na 9^a semana de vida.

4.5 Suco de uva

O suco de uva utilizado no estudo foi o suco de uvas pretas 100% natural integral (Tabela 2), produzido e engarrafado por Adega Casa de Madeira Ltda. Vale dos Vinhedos, 8º distrito, Bento Gonçalves – RS, fabricado em janeiro de 2006, Lote B5 .

Informação Nutricional	
	Por porção de 100mL
Valor Calórico (Kcal)	100
Carboidratos (g)	26
Proteínas (g)	1
Gorduras Totais (g)	1
Gorduras saturadas (g)	0
Colesterol (mg)	0
Fibra alimentar (g)	<1
Cálcio (mg)	16
Ferro (mg)	0,36
Sódio (mg)	0

Tabela 2. Composição nutricional do suco de uva 100% natural presente no rótulo do produto

4.5.1 Avaliação dos polifenóis totais

Para avaliar a concentração de polifenóis totais do suco de uva foi utilizado o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu que utiliza como padrão uma solução de ácido gálico na concentração de 1 mg/mL (modificado de Singleton et al, 1965). Para a realização das dosagens foram utilizados os seguintes reagentes: Folin 1N e Na₂CO₃ 7%.

Foram adicionados 100 μ L de suco de uva (na diluição de 1:20) em 0,4 mL de água destilada, 0,25 mL de Folin 1N e 1,25mL de Na₂CO₃ 7%. Após 40 minutos, a solução adquire coloração azulada que foi medida em espectrofotômetro marca Varian, modelo Cary a 725 nm. Os valores foram expressos em g de ácido gálico.100mL⁻¹ de suco de uva.

4.5.2 Avaliação da capacidade antioxidante por ABTS

O método consiste em gerar radicais de ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) - ABTS (que possuem cor azul) por reação com 2,2-azo-bis (2-amidinopropano) hidrocloreto (ABAP). Baseado na descoloração que ocorre quando o radical cátion ABTS^{•+} é reduzido a ABTS, medindo a capacidade que o componente em questão (suco de uva) tem de ser "scavenger" de radicais em meio hidrossolúvel (Re et al, 1999).

Preparou-se uma solução de 50mL contendo: 10 mg de ABTS / 250 mg de ABAP. Dissolveu-se primeiro o ABTS em água, logo o ABAP. Incubou-se por pelo menos 45 minutos a 45°C (até que a solução possuísse cor azul e a absorvância possuísse um valor aproximado de 0,500). O ensaio foi feito utilizando 3mL de ABTS/ABAP e 10 μ L de suco de uva (na diluição de 1:1 em água). O consumo dos radicais de ABTS foi medido espectrofotometricamente através da diminuição da absorvância a 734 nm, em um tempo fixo (4 minutos), agitando constantemente. Foi também feita uma curva padrão utilizando três concentrações distintas de ácido ascórbico, através da qual foi obtida a equação da reta para realização dos cálculos. Os resultados foram expressos em milimolar de ácido ascórbico usando a curva padrão dose-resposta já descrita para essa substância.

4.5.3 Avaliação da capacidade antioxidante por DPPH

O método consiste em medir o consumo de difenil-1-picrilhidrazil - DPPH (radical estável) espectrofotometricamente através da diminuição da absorbância a 515 nm. Medindo a capacidade que o componente em questão (suco de uva) tem de ser “scavenger” de radicais em meio lipossolúvel (metanol) (Sánchez-Moreno et al, 1998).

Preparou-se 100 mL de solução contendo: 2,5mg de DPPH em metanol. O ensaio foi feito utilizando 3mL da solução de DPPH e 10uL de suco de uva (na diluição de 1:1 em água). O consumo dos radicais de DPPH foi medido espectrofotometricamente através da diminuição da absorbância a 515 nm, em um tempo fixo (10 minutos), agitando constantemente. Foi feita também uma curva padrão utilizando três concentrações distintas de ácido ascórbico, através da qual foi obtida a equação da reta para realização dos cálculos. Os resultados foram expressos em milimolar de ácido ascórbico usando a curva padrão dose-resposta já descrita para essa substância.

4.5.4 Avaliação da capacidade antioxidante do suco em homogeneizado de fígado de rato pela avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico é utilizada como marcador do grau de peroxidação lipídica em sistemas biológicos. Este método detecta de forma inespecífica as substâncias capazes de reagir com o ácido tiobarbitúrico que corresponde, em sua maior parte, ao malondialdeído.

TBARS é determinado em homogeneizado de fígado de rato sem tratamento algum (para preparo do homogeneizado de tecido hepático a cada grama de tecido foram acrescentados 9 mL de KCl) usando um método fluorimétrico (Yagi, 1976).

Para preparo das amostras utilizou-se 0,25mL de homogeneizado de fígado em 1,25mL de buffer fosfato 30mmol/L KCl 120 mmol/L, pH 7,40. Foram adicionados diferentes volumes de suco de uva 2,5/5/10uL (diluído 1:20) aos quais foram acrescentados 15uL de hidropéroxido orgânico de origem sintética, o hidroperóxido de tert-butil (t-BOOH) e esperou-se 40min para que a lipoperoxidação ocorresse. A 1mL deste preparado de homogeneizado de fígado agregou-se 2mL HCl 0,1N, 0,3mL de ácido fosfotúngstico 10% (P/V) e 1mL de ácido tiobarbitúrico 0,7% (P/V). Estas amostras foram colocadas em água em ebulição por 60 minutos. Posteriormente, as TBARS foram extraídas em 5mL de n-butanol. Realizou-se uma breve centrifugação para separar as fases butanólicas e aquosa e se mediu a fluorescência da parte butanólica a 515nm (longitude de onda de excitação) e 553nm (longitude de onda de emissão) em um espectrofluorímetro Hitachi F-3010. A concentração de TBARS é calculada por meio de uma curva de calibração realizada a partir de uma solução padrão de 1,1,3,3-tetrametoxipropano. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ de TBARS.

4.5.5 Avaliação da capacidade antioxidante do suco em homogeneizado de cérebro de rato pela avaliação da inibição de lipoperoxidação por quimiluminescência

Este método consiste em avaliar a inibição da quimiluminescência espontânea de homogeneizado de cérebro por adição de antioxidantes, no caso o suco de uva, em diferentes volumes (Travacio et al, 2000).

A quimiluminescência foi medida em um contador beta (LKB Rack Beta liquid scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizado o canal de trítio. As determinações foram realizadas em sala escura, em frascos de vidro mantidos na penumbra para

evitar a fosforescência ativada pela luz fluorescente. O meio de reação em que foi realizado o ensaio consistiu de: 3,5ml de uma solução reguladora de KCl 140mmol/L, fosfatos 20mmol/L, pH 7,4, na qual foi adicionado 500µL de homogeneizado de tecido cérebro de rato não submetido a tratamento algum (para preparo do homogeneizado de tecido cerebral a cada grama de tecido foram acrescentados 9 mL de KCl). Após, foi realizada uma leitura inicial, considerada esta a emissão de luz basal. Foi adicionado 25/50 e 100 µL de suco de uva na diluição de 1:20 em água destilada no meio de reação. Foi medida, então, a emissão de luz e, dessa foi descontada a emissão basal para fins de cálculos. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps).

4.6 Indução da Hipertensão Pulmonar e Preparação do Sangue

Para indução de hipertensão pulmonar, foi aplicada uma dose única intraperitoneal em cada animal (60 mg/kg) da droga MCT. A diluição da MCT foi em 0,5 mL de HCl 1N, adicionado 0,5 mL de HCl 0,1N, e o ajuste do pH (7.4) foi feito com NaOH 1N. Para completar o volume final foi adicionado soro fisiológico (Singal et al, 2000).

Os animais dos grupos CONTROLE e SUCO receberam uma injeção com mesmo volume de solução salina nas mesmas condições e tempos experimentais. Nas duas semanas subseqüentes à administração da droga ou à injeção de salina foi retirado sangue do plexo venoso retro-orbital dos animais e na última semana de tratamento o sangue foi coletado da cânula utilizada para cateterismo cardíaco. O sangue foi colocado em tubos Eppendorf que foram imediatamente centrifugados a 3000 rpm/10 minutos, e colocados em gelo. Alíquotas de plasma e eritrócitos foram

retiradas e colocadas em tubos Eppendorf para serem armazenados a temperatura de -80°C para posteriores determinações.

4.7 Avaliação hemodinâmica

Para a avaliação de parâmetros hemodinâmicos, os animais foram anestesiados com cetamina (90mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg) administradas intraperitonealmente. A veia jugular direita e a artéria carótida direita foram expostas, primeiro a jugular, depois a carótida e uma cânula (catéter de polietileno PE-50) foi implantada e introduzida até o átrio e ventrículo direito pela veia jugular e até a aorta pela carótida. A pressão sistólica ventricular direita (PSVD), a pressão diastólica final ventricular direita (PDFVD) e a pressão aórtica média (PAM) foram monitoradas usando um transdutor de pressão (Strain-Gauge – Narco Biosystem Miniature Pulse Transducer RP-155, Houston, Texas, USA) ligado a um amplificador de sinais (pressure Amplifer HP 8805C). Os sinais analógicos de pressão foram digitalizados (Windaq – Data Acquisition System, PC) com frequência de amostragem de 1000 Hz, expressos em mmHg.

4.8 Medidas Morfométricas e Preparação de Homogeneizados

Antes do acesso às medidas hemodinâmicas, cada animal foi pesado (balança Marte) e depois das mesmas, estando ainda anestesiados foram mortos por deslocamento cervical. O tórax foi aberto e os órgãos extraídos. O coração foi rapidamente retirado, os átrios separados e pesado, assim pôde-se observar o peso dos ventrículos. O ventrículo direito foi separado do esquerdo e do septo. A

hipertrofia direita foi avaliada pelo peso do ventrículo direito sobre o peso corporal (mg/g) e a hipertrofia cardíaca pelo peso do coração sobre o peso corporal do rato (mg/g). Fígado e pulmão foram extraídos e pesados, a hipertrofia pulmonar e hepática foi avaliada através da respectiva razão do peso úmido do pulmão ou fígado isolado pelo peso corporal, expressada em mg/g. Para preparo do homogeneizado de tecido pulmonar a cada grama de tecido foram acrescentados 5 mL de KCl. Foi acrescentado 10 µL de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) para cada 1 mL do homogeneizado. Após, o tecido pulmonar foi homogeneizado por 40 segundos e centrifugado em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B - Rotor SM 24) por 10 minutos (0-4 °C) a 3000 rpm. O sobrenadante foi separado para a realização das medidas bioquímicas (Llesuy et al, 1985).

4.9 Reação histoquímica à NADPH diaforase

Uma vez que as três isoformas conhecidas da enzima óxido nítrico sintase (nNOS, eNOS e iNOS) possuem atividade NADPH-diaforase (NADPH-d), a reação histoquímica da NADPH-d foi usada neste trabalho e é um procedimento comumente aceito para identificação de NO sintases (Andronowska, A et al 2005). Para isto, outros quatro grupos – CONTROLE, MCT, SUCO e S + MCT (n=4/grupo) foram preparados para identificação da reação histoquímica da NADPH-d.

Os animais foram inicialmente anestesiados (cetamina 90 mg/kg; xilazina 10 mg/kg, i.p.) e submetidos a uma perfusão intracardíaca. Após a abertura do tórax e visualização do coração e do cone arterial, os mesmos foram afastados dos tecidos a sua volta com o intuito de deixá-los mais visíveis. Em seguida, 1000 UI/kg de heparina (Roche) foram injetadas no ventrículo esquerdo para evitar a formação de

coágulos. Após isto, se fez uma incisão no ventrículo esquerdo e por esta se fez passar a cânula do aparelho perfusor. Uma vez visualizada a ponta da cânula na aorta ascendente, a mesma foi fixada por meio de uma pinça hemostática e foi deixado passar 250 mL de solução salina para a lavagem da árvore vascular. Imediatamente após a fixação da pinça e início da passagem de solução salina na aorta, se fez uma incisão no átrio direito para que todo o sistema sanguíneo e de perfusão tivesse saída. Ao término desta lavagem, se deixou passar pelo sistema perfusor 250 mL de solução de paraformaldeído 4% diluída em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,4 (TP) para fixação dos tecidos. Terminada a perfusão, os pulmões foram retirados e colocados em solução de paraformaldeído 4% diluído em TP por 4 horas à temperatura ambiente. Esgotado este período de tempo, os pulmões foram crioprotetidos em solução de sacarose 15 e 30%, preparada em TP, e deixados a 4°C até afundar.

Cortes coronais de 50 µm de espessura foram obtidos em criostato (Leitz Digital 1702) a -20°C e coletados em lâminas gelatinizadas. A reatividade à NADPH-d foi demonstrada pela técnica descrita por Valtschanoff et al (1992). As lâminas foram incubadas em solução de triton X-100 diluído em TP por 10 min à temperatura ambiente. Ao término deste período, esta solução foi substituída pelo meio de incubação, o qual continha 0,5 mg/mL β-NADPH (Sigma), 0,2 mg/mL de azul de nitrotetrazólio (Sigma) e tampão fosfato 0,2 mol/L, pH 7,4, contendo 12 µL Triton X-100. Depois de pré-incubação em temperatura ambiente por 5 minutos, as lâminas, ainda neste meio, foram colocadas a 37°C, onde permaneciam por 4 horas. Após isto, os cortes foram lavados em TP, desidratados em álcoois crescentes, clareados com xilol, cobertos com Entellan e lamínulas. As células positivas apresentavam coloração azul violeta no corpo.

Para controle da reação histoquímica à NADPH-d, os cortes foram incubados na ausência de NADPH. Nenhuma reação positiva ocorreu nesses cortes. Os cortes foram examinados e fotografados com microscópio Nikon Optiphot-2 equipado com uma câmera Nikon FX-35DX.

4.10 Expressão da eNOS por Western Blot

A eletroforese e transferência de proteína foram feitos conforme já descrito por (Laemmli,1970). As concentrações de proteína foram analisadas e utilizadas para normalizar a quantidade de proteína. 90µg de proteína foram expostos à eletroforese em gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando 10% (p/v) de gel separador e 5% (p/v) de gel fixador. As proteínas separadas foram transferidas através de eletroforese para membranas usando tampão Towbin modificado, contendo Tris 20 mmol/L, glicina 150 mmol/L, metanol 20% (v/v), SDS 0,02% (p/v) (pH = 8,3) em uma unidade de transferência Bio-Rad resfriada. Após, os sítios de proteínas inespecíficas foram bloqueados através de 1h de incubação em solução bloqueadora – 5% (p/v) de leite desnatado – em tampão Tris salina 0,1% (p/v), tween-20. As membranas foram processadas por imunodeteccção usando-se os seguintes anticorpos: anticorpo policlonal anti-eNOS, produzido em coelho (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); a ligação do anticorpo primário foi detectada usando o anticorpo secundário anti-coelho, produzido em asno, conjugado com peroxidase de rabanete e as membranas foram reveladas por quimiluminescência.

As autorradiografias geradas foram quantitativamente analisadas com um densitômetro de imagem (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences Europe, IT). Os pesos moleculares das bandas foram determinados usando como referência um marcador padrão de peso molecular (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). Os resultados para cada membrana foram normalizados de acordo com o método de Ponceau red (Klein et al, 1995) e expressos como % de pixels.

4.11 Determinação de Nitratos e Nitritos

Os níveis de nitratos e nitritos no plasma e tecido pulmonar foram medidos pela reação das amostras com o reagente de Griess. Alíquotas de 50µL foram incubadas com cofatores enzimáticos e nitrato redutase por trinta minutos em temperatura ambiente, para conversão do nitrato em nitrito. O nitrito formado foi, então, analisado pela reação deste com o reagente de Griess. Forma-se um composto corado que é medido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm e expresso em mmol/L (Granger, 1999).

A quantificação dos níveis de nitratos foi feita utilizando-se os seguintes reagentes. Reativo de Griess (1 g de Sulfanilamina, 0,1 g de naftiletilenodiamina, 2,3 mL de ácido ortofosfórico 85%, 97,7 mL de água); Tris 1 mol/L, pH 7,5; NADPH 0,02mmol/L; Glicose 6-fosfato (G6P) 5 mmol/L; Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) 10 U/mL e Nitrato redutase (NR) 0,1 U/mL. No meio de reação foram adicionados 50µL de amostra, 10 µL de NADPH, 7 µL de Tris, 23 µL de uma mistura de G6P/G6PDH e 10 µL de NR. A mistura foi incubada à

temperatura ambiente, sob agitação, por 30 minutos. Após, foi adicionado 100µL do reagente de Griess, o qual foi incubado, novamente, à temperatura ambiente sob agitação por mais 10 min e a absorbância foi lida a 540 nm. Os resultados foram avaliados comparando-se com uma curva padrão, utilizando-se nitrato de sódio 1 mmol/L e expressos em mmol/L (Granger,1999).

4.12 Dosagem de dano a lipídios – quimiluminescência iniciada por tBOOH

Este método consiste em adicionar um hidropéroxido orgânico de origem sintética, o hidroperóxido de tert-butil (t-BOOH), à amostra de homogeneizado de tecido avaliando a capacidade de resposta produzida pela amostra. A realização deste tipo de teste consiste no fato de que os hidroperóxidos são espécies químicas bastante instáveis, reagindo com lipídios por um mecanismo radicalar, o qual gera produtos que emitem luz pela amostra em estudo. Este método é um dos mais sensíveis para a medida de lipoperoxidação.

A quimiluminescência foi medida em um contador beta (LKB Rack Beta liquid scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizado o canal de trítio. As determinações foram realizadas em sala escura, em frascos de vidro mantidos na penumbra para evitar a fosforescência ativada pela luz fluorescente. O meio de reação em que foi realizado o ensaio consistiu de: 3,5 mL de uma solução reguladora de KCl 140 mmol/L, fosfatos 20 mmol/L, pH 7,4, na qual foi adicionado 500µL de homogeneizado de tecido pulmonar. Após, foi realizada uma leitura inicial, considerada esta a emissão de luz basal. O hidroperóxido orgânico utilizado foi o

hidroperóxido de tert-butila, na concentração de 400 mmol/L, do qual foi adicionado 30 µL no meio de reação para uma concentração final de 3 mmol/L. Foi medida, então, a emissão de luz e, dessa foi descontada a emissão basal para fins de cálculos. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps) por miligrama de proteína (Gonzalez-Flecha et al., 1991).

4.13 Dosagem da Atividade das Enzimas Antioxidantes

4.13.1 Catalase (CAT)

O ensaio consistiu em medir a diminuição da absorção do peróxido de hidrogênio a 240 nm. Para a medida espectrofotométrica, foram colocadas em cubetas de quartzo o meio de reação (solução reguladora de fosfato 50 mmol/L - pH 7,2) com as alíquotas das amostras (no caso, homogeneizado de pulmão e eritrócitos dos distintos grupos). Logo, se adicionou 20 µL de H₂O₂ (300 mmol/L), o que resultou numa concentração de H₂O₂ de 2 mmol/L (tempo zero). A concentração foi expressa em nmoles/mg de proteína em eritrócitos e pmoles/mg proteína em homogeneizado de pulmão (Aebi, 1984).

4.13.2 Superóxido dismutase (SOD)

A superóxido dismutase catalisa a reação de dois ânions superóxido, com a conseqüente formação de peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a catalase e a glutathione peroxidase. A

velocidade da reação catalisada pela SOD é 10^4 vezes maior que a velocidade de dismutação espontânea em pH fisiológico.

A técnica utilizada neste trabalho para determinação da SOD está baseada na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Dado que não se pode determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, se utiliza a quantificação em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado (Marklund, 1985).

No meio de reação, foram utilizados 973 μL de tampão tris 50 mmol/L (pH 8,2), 8 μL de pirogalol 24 mmol/L, 4 μL de catalase 30 $\mu\text{mol/L}$ e 20 μL de homogeneizado de tecido pulmonar ou eritrócitos. O aumento na absorbância foi acompanhado a 420 nm durante 2 minutos. Esta curva obtida foi utilizada como branco. Foi feita também uma curva padrão utilizando três concentrações distintas de SOD (0,25 U, 0,5 U e 1 U), através da qual foi obtida a equação da reta para realização dos cálculos. Os resultados foram expressos em U /mg proteína.

4.13.3 Glutathione-S-Transferase (GST)

As glutathione transferases são um grupo de enzimas que catalisam reações de conjugação de glutathione (GSH) com vários substratos, tendo um importante papel na detoxificação de agentes alquilantes. Todas as transferases são ativas com o composto cloro-dinitro-benzeno, sendo a conjugação deste com GSH utilizada

para quantificar-se sua atividade. A formação do composto corado dinitro-fenil-glutathiona, foi medida espectrofotometricamente a 340 nm (Mannervik & Gluthenberg, 1981).

A atividade da glutathiona-S-transferase (GST) foi medida acompanhando-se a reação de formação do DNP-SG a 340 nm/L em um meio de reação contendo 850 μ L de tampão fosfato 0,2 mol/L (pH 6,5), 50 μ L de GSH 20 mmol/L, 50 μ L de CDNB 20mmol/L, e 50 μ L de homogeneizado de pulmão. A atividade da GST foi expressa em nmoles/minuto/mg de proteína.

4.14 Quantificação das proteínas - Método de Lowry

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores, que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL (Lowry et al, 1951). Para a realização das dosagens foram utilizados os seguintes reagentes:

- a) NaHCO_3 (bicarbonato de sódio) 2% em NaOH (hidróxido de sódio) 0,1N;
- b) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre) 1%;
- c) $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (tartarato de sódio e potássio) 2%

Foi preparada a fresco uma mistura utilizando-se 50 ml do reagente "a", 0,5 ml do "b" e 0,5 ml do "c".

Foram adicionados 20 μ L de homogeneizado de tecido ou eritrócitos em 0,78 mL de água destilada e 2 mL do reativo descrito acima, aguardando-se 10 minutos. Após esse tempo, foram adicionados com agitação 200 μ L do reativo de Folin Ciocalteau, diluído em água destilada na proporção 1:3. Após 30 minutos, a solução adquire coloração azulada que foi medida em espectrofotômetro marca Varian,

modelo Cary a 625 nm. A concentração de proteínas foi expressa em mg/mL e foi utilizada para normalização da atividade enzimática.

4.15 Análise estatística

Os resultados apresentados foram expressos como média \pm desvio padrão para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados, com o tamanho da amostra (n) de cada grupo mostrado na legenda dos gráficos.

Na análise estatística dos dados, foi utilizado o software GraphPad InStat, versão 3.0 para Windows 98 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia). Foi aplicada análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos. Quando foi feita análise temporal, ANOVA de medidas repetidas foi utilizada. As diferenças foram consideradas significativas quando o nível de significância foi menor que 5% ($P < 0,05$), o nível de significância para cada análise estatística está representado nas legendas das figuras e tabelas.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação do suco de uva

5.1.1 Quantidade de polifenóis totais, ABTS e DPPH do suco

O suco de uva concentrado foi adquirido da Adega Casa de Madeira Ltda ME (Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brasil). Os polifenóis totais foram medidos usando ácido gálico como padrão, resultando em: polifenóis totais 0,43 g/100mL. Ao final do tratamento, os ratos do grupo SUCO, com média de peso de 249,33 g, recebia o equivalente a 10,7 mg de polifenóis totais e o grupo S + MCT, com média de peso de 235,95 g, recebia 10,2 mg de polifenóis totais.

Dos métodos que foram utilizados para determinar a atividade antioxidante com base na capacidade do suco de uva de atuar como seqüestrador de radicais, ABTS que avalia antioxidantes hidrossolúveis e DPPH o qual avalia antioxidantes lipossolúveis, temos como resultado: ABTS - 90,33 mmol/L/100mL e DPPH - 38,35 mmol/L/100mL (ambos utilizando ácido ascórbico como padrão), sugerindo maior concentração de antioxidantes hidrossolúveis em relação aos lipossolúveis.

5.1.2 Avaliação da capacidade antioxidante do suco em homogeneizado de fígado de rato pela avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

À medida que se acrescentou suco de uva em diferentes volumes ao homogeneizado de fígado previamente submetido à lipoperoxidação por ação do t-BOOH, notou-se a redução na concentração de TBARS. A adição de 5 μ L de suco de uva, na diluição 1:20 em água, foi capaz de inibir em 25% a lipoperoxidação iniciada por t-BOOH; a adição de 12,5 μ L deste suco, na mesma diluição, inibiu 63%, enquanto que com adição de 25 μ L a redução foi de 65% (figura 6). Estes resultados demonstram que a lipoperoxidação diminui de maneira diretamente proporcional a adição até certa quantidade de suco adicionada (12,5 μ L), depois desta quantidade a diminuição na lipoperoxidação também ocorre, porém parece atingir um platô. Isto evidencia uma relação dependente da dose no efeito da capacidade antioxidante do suco de uva.



Figura 6. Variação no percentual de inibição da lipoperoxidação avaliada por TBARS (em homogeneizado de fígado de rato sadio) avaliando-se diferentes volumes de suco adicionado.

5.1.3 Avaliação da capacidade antioxidante do suco em homogeneizado de cérebro de rato pela avaliação da inibição de lipoperoxidação por quimiluminescência

A adição de suco de uva em diferentes volumes de homogeneizado de cérebro de rato resultou em redução na QL espontânea deste homogeneizado. Esta redução foi diretamente proporcional ao aumento do volume de suco adicionado. A adição de 25 μ L de suco de uva, na diluição 1:20 em água, foi capaz de inibir a lipoperoxidação por QL em 25%, enquanto 50 μ L, na mesma diluição, inibiu 65% a lipoperoxidação (figura 7). 38 μ L de suco diluído 1:20 seriam suficientes para a inibição de 50% na lipoperoxidação de homogeneizado de cérebro. .

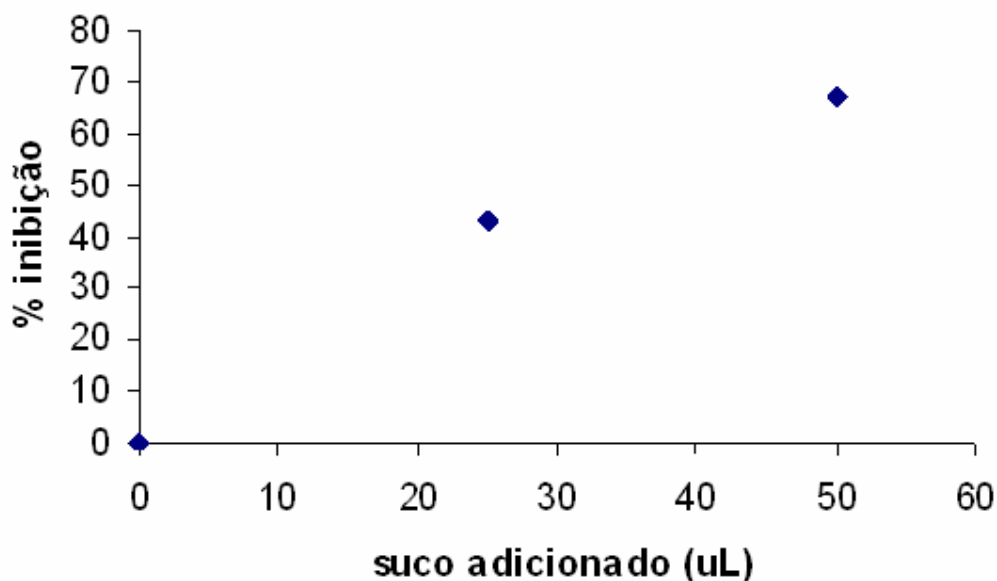


Figura 7. Variação no percentual de inibição da lipoperoxidação avaliada por QL (em homogeneizado de cérebro de rato sadio) avaliando-se diferentes volumes de suco adicionado.

5.2 Crescimento dos animais

A figura 8 contém os dados referentes ao peso em g dos animais em cada semana desde o desmame até a sexta semana de tratamento, término do protocolo experimental.

Os animais foram pesados semanalmente para acompanhamento do crescimento e do ganho de peso durante todo o período de tratamento. A média do peso inicial variou de 49g e a final de 253g. O grupo MCT diminuiu a sua velocidade de ganho de peso na quarta semana de tratamento quando comparado aos grupos CONTROLE e S + MCT ($p < 0,001$). Na quinta semana, observou-se o mesmo padrão, porém uma menor significância quando comparamos os grupos MCT e S + MCT ($p < 0,01$), enquanto que o grupo S + MCT também diferiu significativamente de seu controle SUCO ($p < 0,01$). Na última pesagem dos animais (semana 6), observamos diminuição significativa no grupo MCT quando comparado ao CONTROLE ($p < 0,001$). O grupo S + MCT teve diminuição significativa do peso corporal ($p < 0,01$) quando comparado ao SUCO a partir da quinta semana, porém a média de peso deste grupo apresenta-se significativamente maior do que da média do grupo MCT da quarta à sexta semana. Pelo cálculo do Índice de Lee, medida obtida através do peso corporal do rato pelo seu comprimento e que mensura a distribuição da sua massa corporal, não houve diferença entre os grupos.

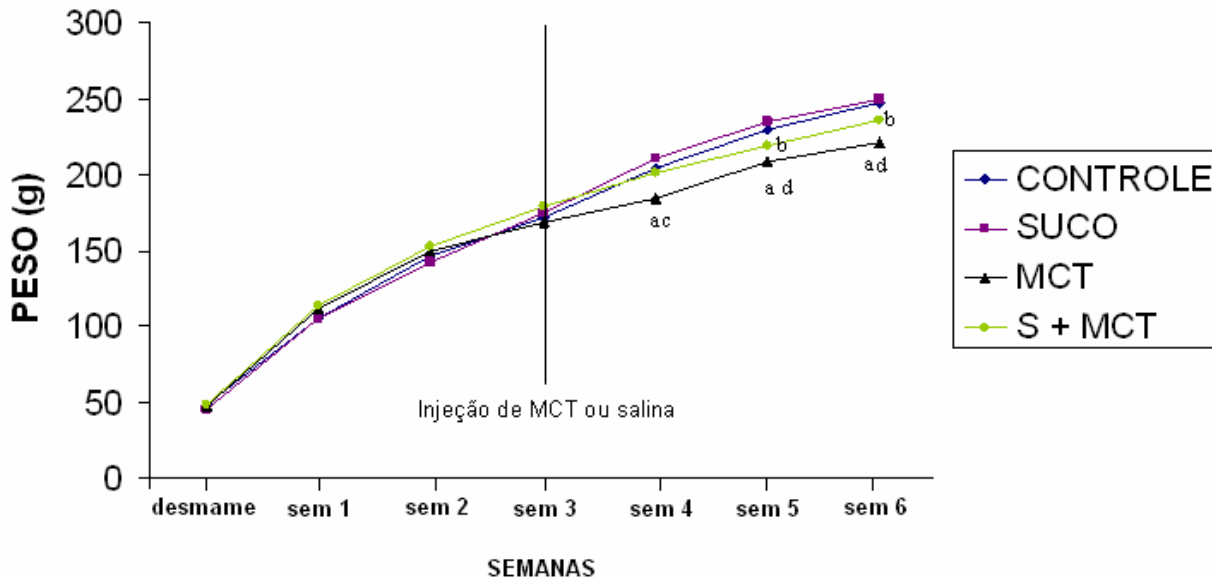


Figura 8 Peso (g) nos distintos grupos experimentais durante todo período de tratamento. Os resultados foram expressos como média \pm DP de 6-8 animais por grupo. a = diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparado ao CONTROLE, b = diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparado ao SUCO, c = diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo S + MCT, d = diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo S + MCT.

5.3 Avaliação morfológica e hemodinâmica

A tabela 3 sumariza os parâmetros morfológicos e hemodinâmicos realizados no trabalho.

5.3.1 Avaliação morfológica de coração – Hipertrofia cardíaca

A determinação da hipertrofia cardíaca é feita pelo peso do coração (VD + VE + septo) dividido pelo peso corporal do animal. A hipertrofia ventricular esquerda e direita são expressas pelo peso do VE + septo ou VD, respectivamente, dividido pelo peso corporal do rato.

Embora tenha sido notada hipertrofia cardíaca nos dois grupos tratados com MCT, não há hipertrofia ventricular esquerda, apenas a razão entre peso do VD e peso corporal mostrou-se significativamente aumentada nos grupos tratados com MCT, MCT com aumento de 30 % na hipertrofia cardíaca e S + MCT aumento de 27 % na hipertrofia cardíaca ($P < 0,001$ e $P < 0,05$, respectivamente) em relação aos seus controles, o que mostra que a hipertrofia cardíaca existente se deve exclusivamente à hipertrofia ventricular direita. Não houve diferença entre os grupos CONTROLE e SUCO em relação ao peso do coração e das câmaras em separado.

5.3.2 Avaliação morfométrica de pulmão – Congestão pulmonar

O dado de congestão pulmonar foi realizado através da razão entre peso úmido do pulmão e peso corporal do rato (mg/g). Foram observadas diferenças significativas nos grupos tratados com MCT quando comparados aos seus controles, CONTROLE e SUCO (ambos com $P < 0,01$). A congestão pulmonar no grupo MCT aumentou 41 % quando comparado ao CONTROLE e S + MCT mostrou-se 32 % elevado comparado ao SUCO. Demonstramos também diminuição de 12% no grupo S + MCT quando comparado ao MCT ($P < 0,05$).

5.3.3 Avaliação Pressão Diastólica Final de Ventrículo Direito (PDFVD)

A medida da pressão diastólica final do ventrículo direito (PDFVD) apresentou-se aumentada (13 %) de forma significativa no grupo MCT quando comparado ao seu controle ($P < 0,05$), o que não foi observado nos grupos tratados com suco. No grupo S + MCT foi observado uma diminuição de 13 % em relação ao

grupo MCT ($P < 0,05$), chegando ao mesmo valor de pressão encontrado no grupo CONTROLE, que não sofreu nenhuma intervenção de tratamento.

5.3.4 Avaliação Pressão Sistólica do Ventrículo Direito (PSVD)

Quando analisamos os registros de pressão sistólica do ventrículo direito dos ratos, realizados através de cateterismo da veia jugular direita, observamos aumento significativo nos grupos tratados com MCT quando comparados aos seus controles ($P < 0,001$) (29 % em MCT e 24 % em S + MCT). Enquanto o grupo S + MCT apresentou diminuição da PSVD de 12 % quando comparado ao MCT ($P < 0,05$).

Tabela 3. Parâmetros morfométricos e hemodinâmicos de ratos que receberam injeção de salina ou monocrotalina (60mg/kg) na terceira semana de tratamento e receberam com água ou suco de uva durante 6 semanas. Resultados medidos ao final do protocolo experimental.

Parâmetros	Grupos			
	CONTROLE	MCT	SUCO	S + MCT
PC (g)	247,83 ± 5,95	221,12 ± 9,7 ^{a d}	249,33 ± 8,16	235,95 ± 8,97
Coração/PC (mg/g)	2,47 ± 0,06	2,74 ± 0,11 ^a	2,46 ± 0,11	2,77 ± 0,15 ^c
VD /PC (mg/g)	0,44 ± 0,02	0,60 ± 0,04 ^a	0,46 ± 0,04	0,61 ± 0,06 ^c
VE+septo/PC (mg/g)	2,17 ± 0,15	2,16 ± 0,20	2,22 ± 0,18	2,20 ± 0,19
Fígado / PC (mg/g)	41,75 ± 2,18	43,42 ± 2,92	41,86 ± 4,01	44,97 ± 3,45
Pulmão / PC (mg/g)	2,74 ± 0,11	4,66 ± 0,37 ^a	2,79 ± 0,27	3,95 ± 0,56 ^{b c}
PDFVD (mmHg)	6,24 ± 0,35	7,11 ± 0,46 ^a	5,86 ± 0,31	6,23 ± 0,34 ^b
PSVD (mmHg)	29,82 ± 1,87	41,31 ± 2,38 ^a	28,95 ± 2,51	36,86 ± 3,32 ^{b c}
PAM (mmHg)	119,71 ± 7,71	120,52 ± 13,80	105,12 ± 13,97	119,57 ± 8,23

Valores expressos como média ± desvio padrão, n=6-8/grupo. CONTROLE = Água Controle; MCT = Água Monocrotalina; SUCO = Suco de Uva Controle, e S + MCT = Suco de Uva + Monocrotalina. PC, peso corporal; VD, ventrículo direito; VE, ventrículo esquerdo, PDFVD = Pressão diastólica final de ventrículo direito; PSVD = pressão sistólica de ventrículo direito e PAM = pressão aórtica média. **a** significativamente diferente quando comparado ao grupo CONTROLE ($P < 0.05$) **b** significativamente diferente quando comparado ao grupo MCT ($P < 0.05$) **c** significativamente diferente quando comparado ao grupo SUCO ($P < 0.05$) **d** significativamente diferente quando comparado ao grupo S + MCT ($P < 0.05$)

5.5 Reação histoquímica à NADPH diaforase

O estudo dos cortes de pulmão com a técnica da NADPH-d mostrou reação positiva em células pulmonares e vasculares. A área nuclear sempre foi negativa. Os cortes controle sempre se mostraram negativos.

A figura 8 mostra a reação histoquímica à NADPH-d em arteríola pulmonar de ratos tratados com salina ou MCT e água ou suco. Nesta região houve uma forte reação, evidenciada pela intensidade da tonalidade azul violácea, no endotélio de todos os grupos experimentais (setas), sendo A = CONTROLE, B = MCT, C = SUCO, D = S + MCT. Uma reação fraca ocorreu no músculo liso das arteríolas destes distintos grupos de animais. Esta camada muscular (túnica média) se mostrou mais espessada apenas nos ratos que receberam MCT (figura 8 B), caracterizando o modelo de hipertensão pulmonar induzida por MCT. Foi realizada a técnica de coloração por hematoxilina-eosina para mostrar de forma mais evidente a diferença do espessamento desta parede muscular em arteríolas (figura 9).

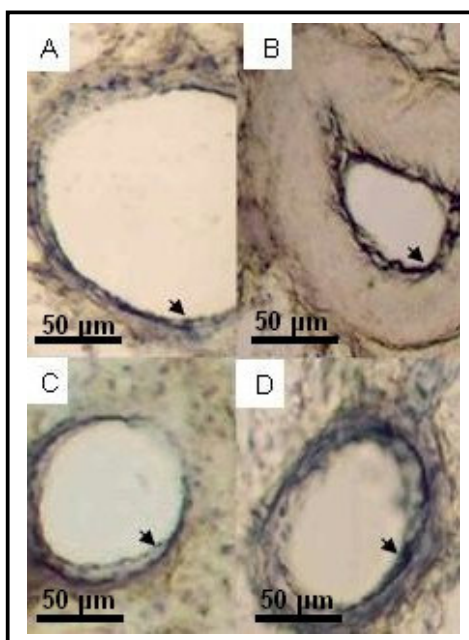


Figura 8 – Reação histoquímica de NADPH diaforase em arteríola de pulmão de ratos tratados com água e salina (A), água e monocrotalina (B), suco e salina (C) e suco e monocrotalina (D). Nota-se reação intensa em endotélio (setas). Uma fraca reação também é observada no músculo liso da arteríola, evidente em B onde essa camada muscular encontra-se espessada. Barra de calibração = 50µm



Figura 9 – Fotomicrografia de arteríola pré-acinar de rato do grupo MCT, com hipertrofia da túnica média – representada à esquerda e arteríola de rato do grupo CONTROLE, sem hipertrofia da camada muscular – representada à direita. Coloração de hematoxilina/eosina. Objetiva 10x. Dado produzido neste estudo

Apesar de não mostrado, a reação a esta enzima também esteve presente no endotélio das veias e vênulas do pulmão dos ratos pertencentes aos grupos experimentais considerados neste estudo.

A figura 10 mostra a reação histoquímica à NADPH-d em bronquíolo pulmonar de ratos de todos os grupos experimentais. Nesta região pulmonar, a forte reação estava localizada nos epitélios bronquiolares de todos os grupos experimentais deste estudo (setas), sendo A = CONTROLE, B = MCT, C = SUCO, D = S + MCT. Os alvéolos e sacos alveolares apresentaram uma fraca reação à NADPH-d (dado não mostrado). Cabe ressaltar ainda que a reação à NADPH-d estava presente no epitélio dos brônquios e na camada de músculo liso destes, sendo nesta última de intensidade muito fraca. Não foram feitas análises quantitativas, os resultados são, apenas, qualitativos.

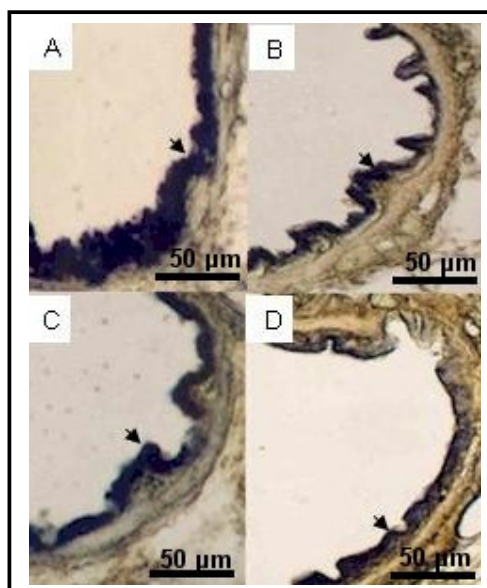


Figura 10 – Reação histoquímica de NADPH diaforase nas vias aéreas – bronquíolos - de pulmão de ratos tratados com água e salina (A), água e monocrotalina (B), suco e salina (C) e suco e monocrotalina (D). Nota-se intensa reatividade nas células epiteliais desta região pulmonar (setas). Barras =50 µm

5.6 Expressão da eNOS por Western Blot

Na figura 11 observa-se expressão proteica de e-NOS avaliada por Western Blot. Essa expressão foi 20 % menor no grupo MCT quando comparado com os demais grupos (CONTROLE = $106,81 \pm 5,37$ e MCT = $81,95 \pm 7,44$ % de pixels). O tratamento com suco de uva impediu a queda na expressão protéica de eNOS no grupo tratado com MCT e suco de uva (Figura 3).

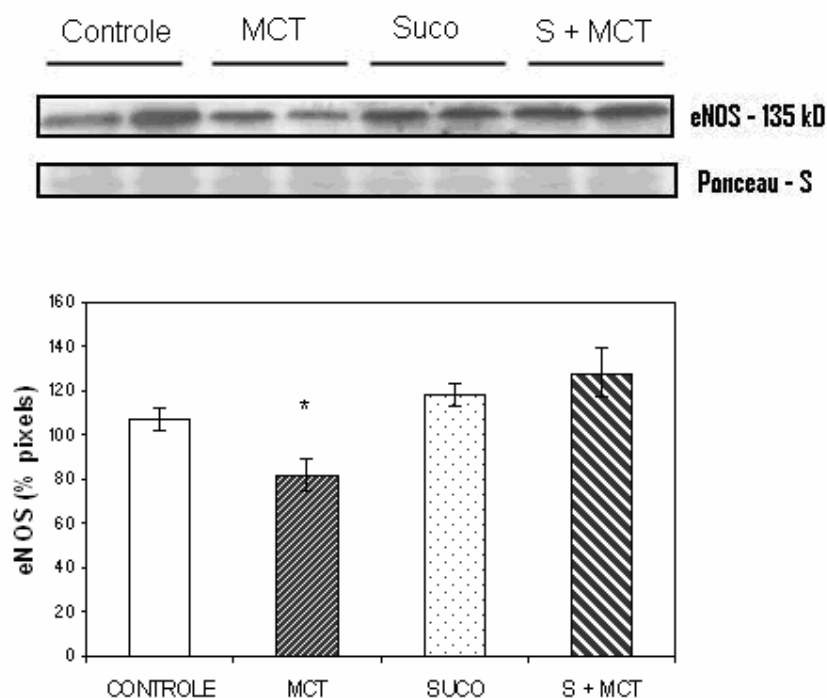


Figura 11: Análise de Western blot em homogeneizados de pulmão utilizando como anticorpo primário e-NOS. Os dados são expressos como média \pm DP de 3-4 animais em cada grupo (um gel representativo de 2 experimentos de Western Blot, mostrando 2 bandas para cada grupo experimental). CONTROLE = Água Controle; MCT = Água Monocrotalina; SUCO = Suco de Uva Controle, e S + MCT = Suco de Uva + Monocrotalina. * difere significativamente dos demais grupos: CONTROLE, SUCO e S + MCT ($P < 0.05$).

5.7 Concentração de Nitratos e Nitritos

A concentração de nitritos+nitratos, metabólitos do óxido nítrico, em homogeneizado de tecido pulmonar está apresentada na figura 12. Pôde-se notar uma diminuição significativa ($P<0,05$) na concentração dos mesmos nos grupos tratados com MCT. De $0,94 \pm 0,06$ no grupo CONTROLE, para $0,73 \pm 0,03$ no MCT e de $1,09 \pm 0,07$ no grupo SUCO para $0,8 \pm 0,2$ no S + MCT. Comparando-se os grupos controles CONTROLE e SUCO, notou-se um aumento de 16% nos nitritos + nitratos do grupo que recebeu apenas suco, que foi significativo ($P<0,05$).

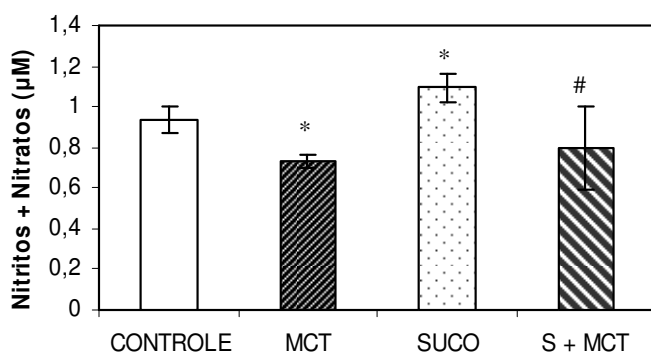


Figura 12: Concentração de nitritos+nitratos em homogeneizados de pulmão. Os dados são expressos como média \pm DP de 6-8 animais em cada grupo. CONTROLE = Água Controle; MCT = Água Monocrotalina; SUCO = Suco de Uva Controle, e S + MCT = Suco de Uva + Monocrotalina. * difere significativamente do grupo: CONTROLE ($P<0,05$), # difere significativamente do grupo: SUCO ($P<0,01$).

A concentração de nitritos+nitratos, metabólitos do óxido nítrico, em plasma, no dia do sacrifício é expressa na figura 13. Pôde-se notar um significativo ($P<0,01$) aumento de aproximadamente 30 % na concentração dos metabólitos do NO no grupo S + MCT em comparação aos demais grupos. Comparando as concentrações em pulmão e em plasma notamos um perfil diferente nos resultados das

concentrações. A avaliação em plasma nos fornece indícios de como está o balanço sistêmico desses metabólitos, enquanto em pulmão se pode inferir o que ocorre no tecido separadamente.

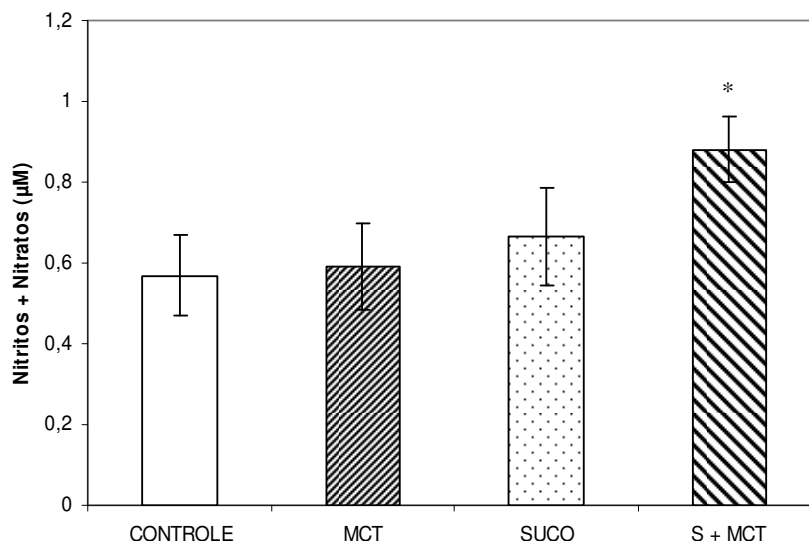


Figura 13: Concentração de nitritos+nitratos em plasma. Os dados são expressos como média \pm DP de 6-8 animais em cada grupo. CONTROLE = Água Controle; MCT = Água Monocrotalina; SUCO = Suco de Uva Controle, e S + MCT = Suco de Uva + Monocrotalina. * difere significativamente dos demais grupos: CONTROLE, MCT e SUCO ($P < 0,01$).

A flutuação das concentrações de Nitritos+Nitratos, metabólitos do óxido nítrico, em plasma após a primeira, segunda e terceira (dia do sacrifício) semanas após administração de salina ou MCT são expressas na figura 14. Pôde-se notar que, na primeira semana, o grupo S + MCT já se destacava por ter maior concentração dos metabólitos que os demais grupos tratados com água, só não diferia do grupo SUCO ($P < 0,05$). Na segunda semana, houve aumento nos nitritos + nitratos em plasma dos animais tratados com água e essa concentração foi significativamente maior do que a da semana anterior dos dois grupos que receberam água e também foi maior que dos grupos tratados com suco. O grupo S + MCT sofreu decréscimo na concentração dos metabólitos em relação à semana 1,

diferindo dos grupos água, porém não diferindo do grupo SUCO. Na terceira semana, o grupo S + MCT recuperou seus níveis de nitritos + nitratos, diferindo da semana 2 e voltando a ter os níveis da semana 1. Os grupos tratados com água tiveram resposta contrária ao grupo S + MCT, pois suas concentrações de metabólitos de NO sofreram decréscimo, voltando aos níveis da primeira semana. No grupo SUCO não houve alteração ao longo das três semanas.

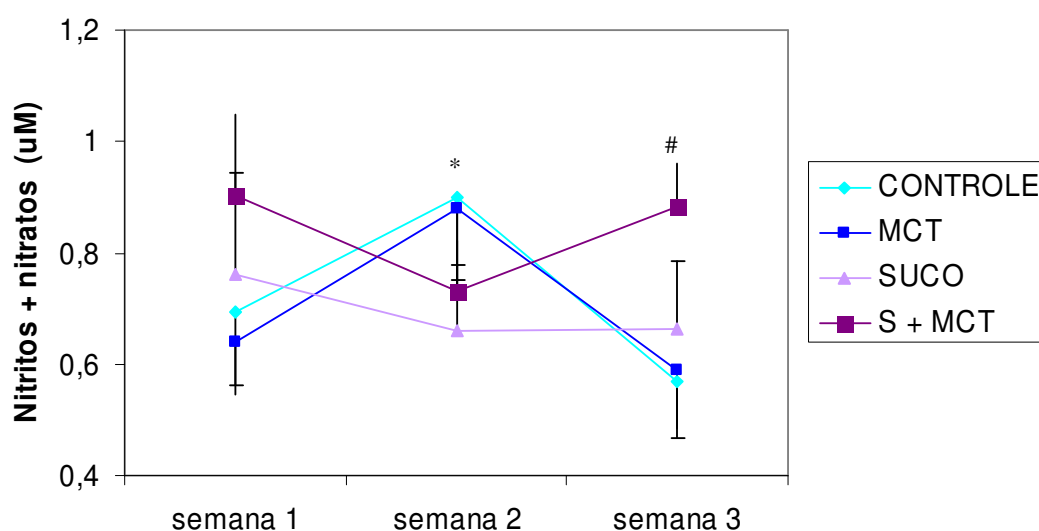


Figura 14: Concentração de nitritos+nitratos em plasma ao final de cada semana após ter recebido injeção de salina ou MCT. Os dados são expressos como média \pm DP de 6-8 animais em cada grupo. CONTROLE = Água Controle; MCT = Água Monocrotalina; SUCO = Suco de Uva Controle, e S + MCT = Suco de Uva + Monocrotalina. * grupo CONTROLE e MCT diferem significativamente dos grupos: SUCO e S + MCT na mesma semana e diferem de seus valores basais na primeira semana ($P < 0.05$), # grupo S + MCT difere significativamente dos grupos: CONTROLE, MCT e SUCO na mesma semana e difere de seu valor segunda semana ($P < 0.05$), no grupo SUCO não houve diferença significativa ao longo das 3 semanas.

5.8 Dosagem de dano a lipídios por quimiluminescência iniciada por t-BOOH e Atividade das Enzimas Antioxidantes

As mudanças ocorridas no dano oxidativo a lipídios e na atividade enzimática de CAT, GST e SOD em homogeneizado de tecido pulmonar são mostradas na tabela 4.

5.8.1 Lipoperoxidação por quimiluminescência

A lipoperoxidação (LPO) foi significativamente ($P<0,05$) aumentada no grupo MCT comparado com o grupo CONTROLE que teve 14465 ± 2400 cps/mg prot. A administração de suco de uva resultou na diminuição de 70% e 63% na LPO, respectivamente nos grupos SUCO (4346 ± 439 cps/mg prot) e S + MCT (6023 ± 1088 cps/mg prot) quando comparados aos seus respectivos controles ($P<0.05$). Também foi observado aumento de LPO em 38% no grupo S + MCT quando comparado ao grupo SUCO, mesmo assim um dano muito mais baixo do que os animais tratados com água. Embora a MCT determine dano oxidativo, a administração de suco de uva mantém esse dano mais baixo em tecido pulmonar quando comparado a animais que receberam apenas água e tinham hipertensão pulmonar. Comparando-se apenas o grupo SUCO ao CONTROLE notamos que a diminuição na lipoperoxidação com a administração de suco pôde ser evidente também em animais saudáveis.

5.8.2 Atividade das enzimas antioxidantes

A MCT aumenta significativamente a atividade da CAT em 42% no grupo MCT ($76,3 \pm 9,5$ nmol/mg) comparado com o grupo CONTROLE ($53,5 \pm 8,6$ nmol/mg), sugerindo que há aumento na concentração de H_2O_2 e a enzima aumenta sua atividade para compensar o dano oxidativo. Há também um significativo aumento de 48% na CAT em ambos grupos tratados com suco de uva quando comparados com o grupo CONTROLE. Por outro lado, a atividade da SOD está aumentada apenas no grupo MCT ($7,16 \pm 1,13$ U/mg prot) em relação ao CONTROLE ($6,37 \pm 1,07$ U/mg prot) ($P < 0.05$), enquanto os grupos tratados com suco de uva têm atividade mais baixa desta enzima quando comparados aos grupos tratados com água.

Tabela 4. Parâmetros de estresse oxidativo em homogeneizado de tecido pulmonar de ratos Wistar machos que receberam injeção única de salina ou monocrotalina (60mg/kg) na terceira semana de tratamento e foram tratados com água ou suco de uva durante 6 semanas. Resultados medidos ao final do protocolo experimental, 3 semanas após receberem a injeção de salina ou monocrotalina

Parâmetros	Grupos			
	CONTROLE	MCT	SUCO	S + MCT
LPO (cps/mg prot)	14465 ± 2400	16389 ± 1179^a	4346 ± 439^a	6023 ± 1088^{bc}
CAT (pmol/mg prot)	$53,5 \pm 8,6$	$76,3 \pm 9,5^a$	$79,4 \pm 4,9^a$	$78,4 \pm 3,3^a$
SOD (U/mg prot)	$6,37 \pm 1,07$	$7,16 \pm 1,13^a$	$4,94 \pm 0,83^a$	$4,43 \pm 0,69^b$
GST (pmol/min/mg prot)	$42,1 \pm 1,2$	$59,4 \pm 2,4^a$	$49,2 \pm 1,9$	$58,3 \pm 1,4^c$

Valores expressos como média \pm DP, n=6-8/grupo. CONTROLE = Água Controle; MCT = Água Monocrotalina; SUCO = Suco de Uva Controle, e S + MCT = Suco de Uva + Monocrotalina. LPO= lipoperoxidação; CAT = atividade da enzima antioxidante catalase, GST = atividade da enzima antioxidante glutathione-S-transferase, e SOD = atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase.

a significativamente diferente quando comparado ao grupo CONTROLE ($P < 0.05$)

b significativamente diferente quando comparado ao grupo MCT ($P < 0.05$)

c significativamente diferente quando comparado ao grupo SUCO ($P < 0.05$)

A flutuação da atividade da CAT em eritrócitos após a primeira, segunda e terceira (dia do sacrifício) semanas após administração de salina e MCT está expressa na figura 15. Pôde-se notar que, na primeira e na terceira semana, os grupos não diferiram significativamente ($P>0,05$) um do outro. Na segunda semana, houve aumento significativo da atividade da catalase nos grupos tratados com suco, onde grupo SUCO na segunda semana diferiu do mesmo grupo na primeira e terceira semanas e diferiu dos demais grupos na mesma semana. Já o grupo S + MCT também diferiu do mesmo grupo na primeira e terceira semanas, porém não foi diferente dos grupos CONTROLE e MCT na segunda semana, sendo diferente do grupo SUCO nesta segunda semana ($P<0,05$). Na terceira semana, houve significativo decréscimo na atividade da catalase em todos os grupos quando comparados a eles mesmos nas 2 semanas anteriores.

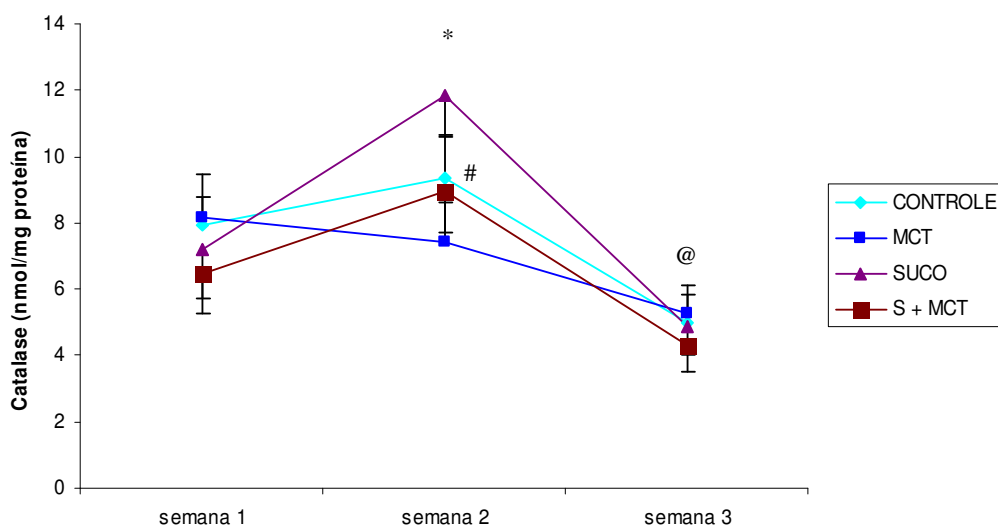


Figura 15: Atividade da catalase (CAT) em eritrócitos ao final de cada semana após ter recebido injeção de salina ou MCT. Os dados são expressos como média \pm DP de 6-8 animais em cada grupo. CONTROLE = Água Controle; MCT = Água Monocrotalina; SUCO = Suco de Uva Controle, e S + MCT = Suco de Uva + Monocrotalina. * grupo SUCO difere significativamente dos grupos: CONTROLE, MCT e S + MCT na mesma semana e difere de seus valores basais na primeira e terceira semanas ($P<0,05$), # grupo S + MCT difere significativamente do grupo SUCO na mesma semana e difere de seus valores na primeira e terceira semanas ($P<0,05$), @ houve diferença significativa de todos os grupos comparados a eles mesmos na primeira e segunda semanas.

A flutuação da atividade da SOD em eritrócitos após a primeira, segunda e terceira (dia do sacrifício) semanas após administração de salina e MCT está expressa na figura 16. O grupo MCT sempre apresentou valores significativamente ($P<0,05$) mais altos de atividade de SOD que o grupo CONTROLE ao longo das 3 semanas e não variou significativamente nas 3 semanas quando comparado a ele mesmo. Já os grupos tratados com suco apresentaram valores significativamente mais baixos de SOD que o grupo MCT na primeira semana, porém esses valores foram crescentes ao longo das semanas 2 e 3, não diferindo do grupo MCT nestas semanas, apenas diferindo sempre do grupo CONTROLE. Na última semana, a atividade da SOD esteve mais alta nos grupos MCT, SUCO e S + MCT, diferindo significativamente do grupo CONTROLE ($P<0,01$).

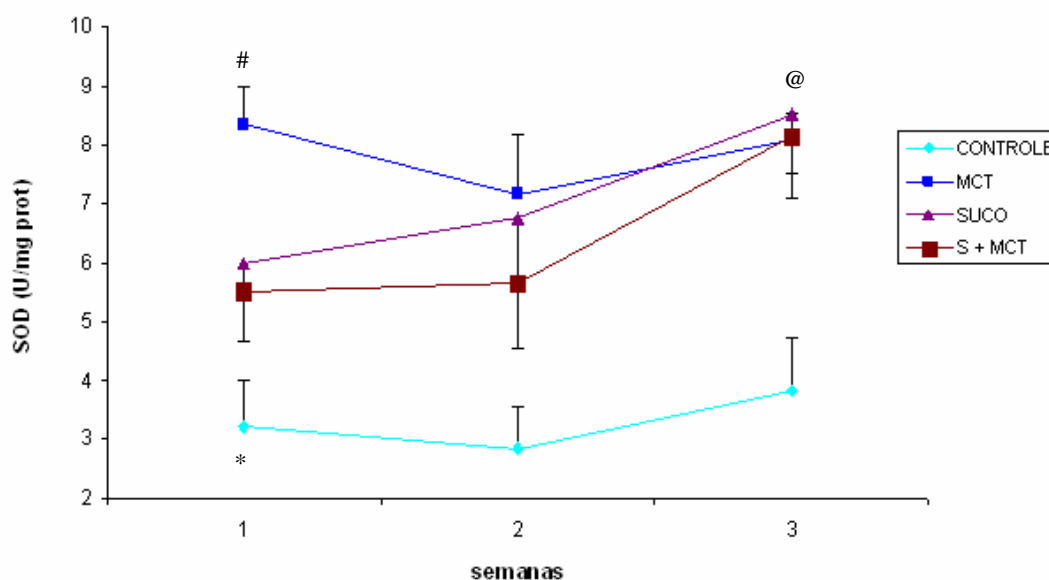


Figura 16: Atividade da superóxido dismutase (SOD) em eritrócitos ao final de cada semana após ter recebido injeção de salina ou MCT. Os dados são expressos como média \pm DP de 6-8 animais em cada grupo. CONTROLE = Água Controle; MCT = Água Monocrotalina; SUCO = Suco de Uva Controle, e S + MCT = Suco de Uva + Monocrotalina. * grupo CONTROLE difere significativamente dos grupos: MCT, SUCO, e S + MCT na mesma semana ($P<0,05$) e não difere de seus valores ao longo das três semanas ($P>0,05$), # grupo MCT difere significativamente dos grupos: CONTROLE, SUCO, e S + MCT na mesma semana ($P<0,05$) e não difere de seus valores ao longo das três semanas ($P>0,05$), @ grupo SUCO e S + MCT diferem de seus resultados nas semanas anteriores e diferem do grupo CONTROLE na mesma semana ($P<0,05$)

6. DISCUSSÃO

A estimativa da ingestão dietética de fenóis e polifenóis em humanos pode variar entre de 100 mg a 2000 mg per capita por dia (Lindsay & Clifford 2000). Considerando as devidas proporções, enquanto a estimativa máxima de consumo para um adulto humano de 70 kg é de 28 mg/kg polifenóis totais, o consumo médio diário para ratos adultos do grupo SUCO, por exemplo, foi de 43 mg/kg, 1,5 vezes mais do que em adultos que consomem dietas consideradas ricas em polifenóis. Isso demonstrou que a bebida administrada garantia rica fonte de componentes fenólicos. Houve o cuidado de administrarmos o suco de uva integral da mesma marca e mesmo lote nos grupos experimentais para garantir igual quantidade de compostos fenólicos aos mesmos, pois há variáveis que interferem na concentração e composição desses compostos fenólicos como: espécies de uva utilizados, cultivares, época de maturação, clima, estações do ano de cultivo, solo em que foram cultivados (Jackson, 1994; Mazza et al, 1999). Portanto, os resultados encontrados não podem ser extrapolados para qualquer tipo de suco.

Os resultados de capacidade antioxidante por ABTS e DPPH do presente estudo indicam que o suco de uva teve potente capacidade antioxidante como

seqüestrador de radicais, quando comparado à vitamina C, usada como padrão já estabelecido. Como esses métodos avaliaram a atividade antioxidante do suco isoladamente, o passo seguinte foi avaliar sua capacidade antioxidante em material biológico sadio. Para tanto utilizamos cérebro e fígado de um grupo de ratos sadios, e avaliamos a habilidade do suco acrescentado a esses tecidos em reduzir a lipoperoxidação (avaliada por QL espontânea em cérebro e TBARS iniciado por t-BOOH em fígado), o que também nos trouxe resultados surpreendentes na redução da LPO, chegando a reduzir em até 65% a mesma nesses tecidos. Com base nesses achados, passamos a avaliar o que a administração de suco na dieta poderia fazer em relação a LPO de pulmão em situação controle e de doença pulmonar. A presença de suco na dieta foi capaz de reduzir a LPO em pulmão de ratos em aproximadamente 3 vezes, em comparação aos níveis encontrados nos animais que receberam apenas água, considerando os animais que receberam apenas suco e os animais que receberam suco e MCT. Diversos componentes encontrados no suco de uva, incluindo os níveis de polifenóis totais avaliados, podem estar contribuindo para esses efeitos.

Os principais achados deste estudo foram: atenuação da disfunção ventricular direita e congestão pulmonar induzida por MCT e sua associação com menor dano oxidativo pulmonar com manutenção de alta biodisponibilidade de óxido nítrico quando o suco de uva foi administrado diariamente, com caráter preventivo antes da indução da hipertensão pulmonar e terapêutico depois da indução da mesma.

O modelo experimental de MCT tem sido utilizado para avaliar os efeitos da hipertensão pulmonar na proliferação da camada íntima, hipertrofia ventricular direita, regulação da expressão gênica, modulação neuroendócrina e mudanças hemodinâmicas (Werchan et al, 1989), buscando, com isso, compreender melhor os

mecanismos envolvidos na patogênese da hipertensão pulmonar idiopática em humanos.

Os danos iniciais causados pela MCT são bem conhecidos e resultam na degeneração ou hiperplasia do endotélio pulmonar, hipertrofia da túnica média das arteríolas pulmonares e edema adventicial, resultando no aumento da resistência vascular pulmonar, aumentando assim a pressão no ventrículo direito (Wilson et al, 1992). Nossos resultados estão de acordo com os resultados hemodinâmicos e morfométricos descritos em outros estudos (Pan et al, 1993; Farahmand et al, 2004; Hessel, 2006), tendo sido estabelecido o modelo experimental. A administração de MCT em ratos tratados com água proporcionou menor ganho de peso, congestão pulmonar, hipertrofia da túnica média de arteríolas pulmonares, hipertrofia de ventrículo direito em comparação com o grupo CONTROLE, aumento nas pressões sistólica e diastólica final de ventrículo direito. Nesses ratos, também se observou dispnéia a partir da segunda semana e perda de pêlo, caracterizando a injúria.

Dentre os mecanismos envolvidos na patogênese da hipertensão pulmonar em modelo animal de MCT podemos citar o estresse oxidativo (Farahmand et al, 2004) e a produção deficiente de óxido nítrico em função da expressão diminuída da eNOS (Hart, 1999). Com o intuito de examinar o papel do estresse oxidativo neste modelo experimental, e como o suco de uva poderia modular este fenômeno, nós analisamos algumas das mais importantes defesas antioxidantes enzimáticas primárias (SOD e CAT, em pulmão e eritrócitos e GST, apenas em pulmão) e um parâmetro de dano oxidativo pulmonar, a lipoperoxidação. Também examinamos a produção de óxido nítrico, avaliando a concentração de seus metabólitos em plasma e pulmão e quantificamos a expressão de eNOS em pulmão.

Estudos clínicos confirmam que a isoforma eNOS está presente no endotélio de vasos pulmonares de indivíduos saudáveis, mas sua expressão é mais baixa em pacientes com hipertensão pulmonar primária. Isso sugere que a vasoconstrição e o aumento na túnica média dos vasos pulmonares, que são conseqüências da doença, podem ser associados ao decréscimo na expressão de eNOS (Giaid & Saleh, 1995). No nosso estudo, os animais do grupo MCT apresentaram menor expressão protéica de eNOS em tecido pulmonar, bem como redução na produção de NO no mesmo tecido, por análise de seus metabólitos nitritos e nitratos, além de aumento exagerado da camada muscular média de arteríolas pulmonares observado na técnica histológica, ressaltando a luz destes vasos pulmonares bastante reduzida.

Além disso, comparando-se o grupo MCT com o CONTROLE, houve aumento acentuado na LPO em pulmão, o que nos leva a supor que está havendo acúmulo de ERO, geradas pela lipoperoxidação, nos ratos do grupo MCT e o sistema enzimático está tentando detoxificar estas espécies aumentando a atividade enzimática da SOD, CAT e GST. Uma vez que a SOD utiliza ânion superóxido como substrato, o caminho subsequente é a formação de peróxido de hidrogênio e dentre as enzimas responsáveis por detoxificá-lo está a CAT (Figura 17).

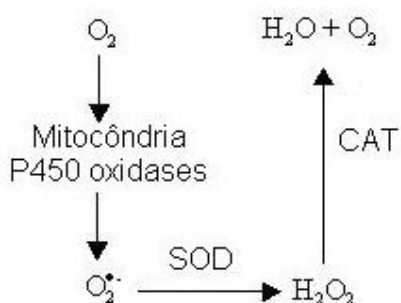


Figura 17. Esquema geral de produção de espécies ativas de oxigênio e metabolização pela SOD = superóxido dismutase e CAT = catalase. Adaptado de Dröge, 2002.

A GST é uma enzima que catalisa a reação de combinação da glutathiona reduzida (GSH) com outras substâncias tóxicas, que possam vir a prejudicar o funcionamento celular. Essa combinação forma os conjugados de glutathiona que serão exportados para fora do meio interno da célula, desempenhando um papel importante na detoxificação celular (Mannervik & Gluthemberg, 1981). Os dois grupos tratados com MCT, independente de receber suco ou não, apresentaram a atividade desta enzima significativamente aumentada, nos levando a concluir que a GST estava exercendo sua ação de detoxificação da MCT, agente xenobiótico.

No modelo de MCT, nesta janela temporal de 3 semanas, mesmo com o aumento na lipoperoxidação não podemos dizer que há estresse oxidativo, uma vez que a defesa enzimática também está elevada no intuito de compensar o dano.

Dados a respeito de insuficiência cardíaca mostram que o estresse oxidativo é primariamente causado pela elevação da produção de compostos pró-oxidantes antes do declínio das defesas antioxidantes (Tsutsui, 2006), o que nos leva a concluir que nestas 3 semanas o organismo está tentando minimizar o dano causado e o quadro de insuficiência cardíaca congestiva ainda não está instalado. Farahmand et al (2004) analisando parâmetros de estresse oxidativo em modelo experimental de *Cor pulmonale* também demonstraram que há aumento das enzimas antioxidantes na primeira e segunda semanas após administração de MCT, porém redução significativa das mesmas na sexta semana após MCT.

O aumento de pressão diastólica final e sistólica do VD e ainda a hipertrofia cardíaca também corroboram como mecanismos compensatórios que o organismo utiliza para manter o rendimento cardíaco pelo bombeamento sanguíneo que encontra uma maior resistência vascular no leito pulmonar.

O estudo de Hill e Singal (1996) mostrou que a progressão da insuficiência cardíaca está associada ao aumento no dano a lipídeos. Porém, o decréscimo do dano oxidativo através da suplementação de antioxidantes se relaciona com melhora no quadro de insuficiência cardíaca (Dhalla e Singal, 1994; Singal et al, 1998; Palace et al, 1999).

Avaliando os efeitos do suco de uva nas alterações produzidas pela MCT, observamos melhora de vários parâmetros. Conforme pode ser sumarizado na Tabela 5.

Tabela 5. Quadro comparativo entre o grupo de ratos MCT e S + MCT

<i>Peso corporal</i>	$MCT < S + MCT$
Congestão Pulmonar	$MCT > S + MCT$
Hipertrofia cardíaca	$MCT = S + MCT$
PSVD	$MCT > S + MCT$
PDFVD	$MCT > S + MCT$
PAM	$MCT = S + MCT$
eNOS (pulmão)	$MCT < S + MCT$
Nitritos+Nitratos (pulmão)	$MCT = S + MCT$
LPO (pulmão)	$MCT > S + MCT$
SOD (pulmão)	$MCT > S + MCT$
CAT (pulmão)	$MCT = S + MCT$
GST (pulmão)	$MCT = S + MCT$

O retardo no ganho de peso e a congestão pulmonar, constatada nos grupos que receberam a droga, foram significativamente menores no grupo S + MCT

quando comparado ao MCT, o que mostra que o suco de uva consegue manter o crescimento normal dos animais, mesmo com a administração da droga e atua de forma positiva no estado de saúde geral dos animais, assim como na perfusão pulmonar. Os dois dados indicam que o suco de uva está freando a progressão do agravo da doença.

Quando há perda de peso, sugere-se que esta seja devido a danos gastrintestinais e/ou hepáticos causados pela toxicidade da MCT (Pichardo, 1999). Uma vez que a absorção e metabolismo dos compostos polifenólicos está relacionada com a microflora intestinal que degrada os flavonóides em ácidos fenólicos simples, os quais serão absorvidos no fígado (Rice-Evans, 2001), estes compostos podem estar atuando na diminuição dos efeitos gastrintestinais e/ou hepáticos causados pela MCT. A hipótese de que o aumento no ganho de peso do grupo S + MCT comparado ao MCT seja devido a ingestão do suco, bebida com calorias (1kcal/mL), é descartada, uma vez que antes da administração da droga o crescimento é parelho entre todos os grupos.

A hipertrofia ventricular direita ocorreu de forma semelhante nestes dois grupos, porém os efeitos da administração de suco de uva nos registros de pressão ventricular direita – PSVD e PDFVD – demonstraram ser protetores no grupo S + MCT, com a diminuição dos níveis de PDFVD e PSVD quando comparado ao grupo MCT. Fato que pode estar relacionado ao efeito vasodilatador dos compostos polifenólicos diminuindo a resistência pulmonar. Não se pode descartar a hipótese de que a melhora da eficiência cardíaca pelos compostos fenólicos seja determinada por mecanismos intrínsecos do coração o que está retardando outras conseqüências do aumento das pressões.

Outros estudos já demonstraram que a ingestão de suco de uva melhora a vasodilatação mediada pelo fluxo, a função plaquetária e as respostas inflamatórias em pacientes com doença coronariana (Stein et al, 1999; Chou et al 2001, Albers et al, 2004), e reduz a pressão sanguínea em pacientes moderadamente hipertensos (Park et al, 2004). Alternativamente, a proteção vascular também pode ser devida à ação direta dos polifenóis nas células endoteliais, resultando em aumento da formação de óxido nítrico (Freedman et al, 2001).

Embora o foco principal na ação dos flavonóides seja sua propriedade antioxidante, existe uma nova visão de que os flavonóides e seus metabólitos podem não apenas agir convencionalmente como antioxidantes doadores de hidrogênio, mas podem exercer ação modulatória nas células através de ativação de vias de sinalização intracelular por mecanismos que envolvem proteínas cinase, gerando várias respostas de sobrevivência celular e aumento de NO, por exemplo (Williams et al, 2004).

Foi mostrado por Ozaki et al (2001) que o aumento na produção de NO derivado da eNOS pode inibir, não apenas o aumento da pressão sistólica direita associado à hipertensão pulmonar, mas também o remodelamento da vasculatura pulmonar e a hipertrofia cardíaca direita induzida por hipóxia crônica, sugerindo um papel potencial terapêutico do aumento da expressão da eNOS do endotélio vascular pulmonar.

Recentemente, estudos de hipertensão pulmonar em modelo animal têm demonstrado que a prevenção ou reversão do desenvolvimento da hipertensão pulmonar está associada com a restauração dos níveis de atividade de eNOS em vários tratamentos (Abe et al, 2004; Fagan, 2004; Hironaka, 2003; Zhao, 2003). Nossos resultados mostram que a administração de suco de uva manteve alta a

expressão de eNOS em tecido pulmonar o que sugere que a atenuação da hipertensão pulmonar induzida por MCT nos ratos tratados com suco de uva pode estar, ao menos em parte, associada à restauração da biodisponibilidade de NO. No grupo S + MCT os níveis de nitritos + nitratos em pulmão encontram-se diminuídos com relação ao grupo SUCO, porém em plasma estão aumentados. Essa medida não é tão específica quanto à expressão protéica da enzima, ainda mais em tecido pulmonar onde o NO exerce múltiplos papéis. O aumento na concentração dos metabólitos do NO não significa maior biodisponibilidade deste gás para que possa exercer seu papel vasodilatador, uma vez que nitritos e nitratos são originados de diversas reações e podem interagir ainda com outros compostos como aminas, por exemplo, gerando nitrosaminas (Halliwell & Gutteridge, 1999). A medida da atividade da NOS, como perspectiva futura, poderia corroborar com esses resultados.

Os efeitos protetores antioxidantes dos polifenóis, presentes no suco de uva, podem ser explicados por sua habilidade em serem seqüestradores de ânions superóxido, radicais peroxil e peroxinitrito (Hu et al, 1995; Sato et al, 1999; Aldini et al, 2003). Alternativamente, foi descrito que o efeito protetor pode ser devido à habilidade dos polifenóis em inibir a expressão e atividade de enzimas pró-oxidantes como NADPH-oxidase e xantina oxidase, e aumentar enzimas antioxidantes como a catalase (Ying et al, 2003; Lin et al, 2000). Anselm et al, 2007 sugeriram em seus achados que o efeito vasoprotetor dos polifenóis era devido a uma ação dupla: uma moderada ação pró-oxidante em células endoteliais para aumentar os mecanismos protetores envolvendo o óxido nítrico e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio - EDHF, e uma ação antioxidante em células musculares vasculares e em plaquetas. Estes dados da literatura ajudam a explicar a diminuição da atividade da SOD nos ratos tratados com suco de uva no nosso estudo, independente de administração ou

não de MCT. O que podemos supor é que os polifenóis da uva poderia reduzir (pelas ações descritas) as concentrações de superóxido no tecido pulmonar, o que reduziria a atividade da SOD por redução de substrato.

Ying et al (2003) sugerem que o aumento da catalase em células endoteliais encontrado em seu estudo, utilizando polifenóis do chá, esteja relacionado o papel preventivo protetor da catalase em detoxificar H_2O_2 que aumenta a permeabilidade endotelial colaborando para disfunção endotelial. Outros estudos ainda indicam que níveis aumentados H_2O_2 estão presentes com aumento de NO e que a detoxificação da espécie reativa de oxigênio é necessária para manter o bom funcionamento de células endoteliais (Okayama et al, 1997; Brennan et al, 2002). Isso nos ajuda, em parte, a entender porque a atividade da catalase pulmonar em nosso estudo esteve aumentada nos dois grupos tratados com suco e com a administração de MCT esse aumento foi mantido.

Com base nos dados de LPO, foi observada diminuição significativa do grupo tratado com SUCO quando comparado ao que recebeu água, o que mostra benefício do tratamento independente da instalação de uma doença. Embora a MCT determine dano a lipídeos, pois também houve aumento significativo na LPO comparando-se S + MCT com SUCO. Como o suco por si só reduz essa LPO comparada ao CONTROLE, o aumento na LPO do grupo S + MCT continuou sendo significativamente mais baixo com relação ao MCT e ao grupo que recebeu apenas água e salina, demonstrando proteção.

Os antioxidantes exógenos, presentes no suco de uva podem atuar como doadores de hidrogênio, assim como podem seqüestrar oxigênio singlet e radical superóxido, reduzindo assim a reação em cadeia da lipoperoxidação (Seyoum et al, 2006) (Figura 18).

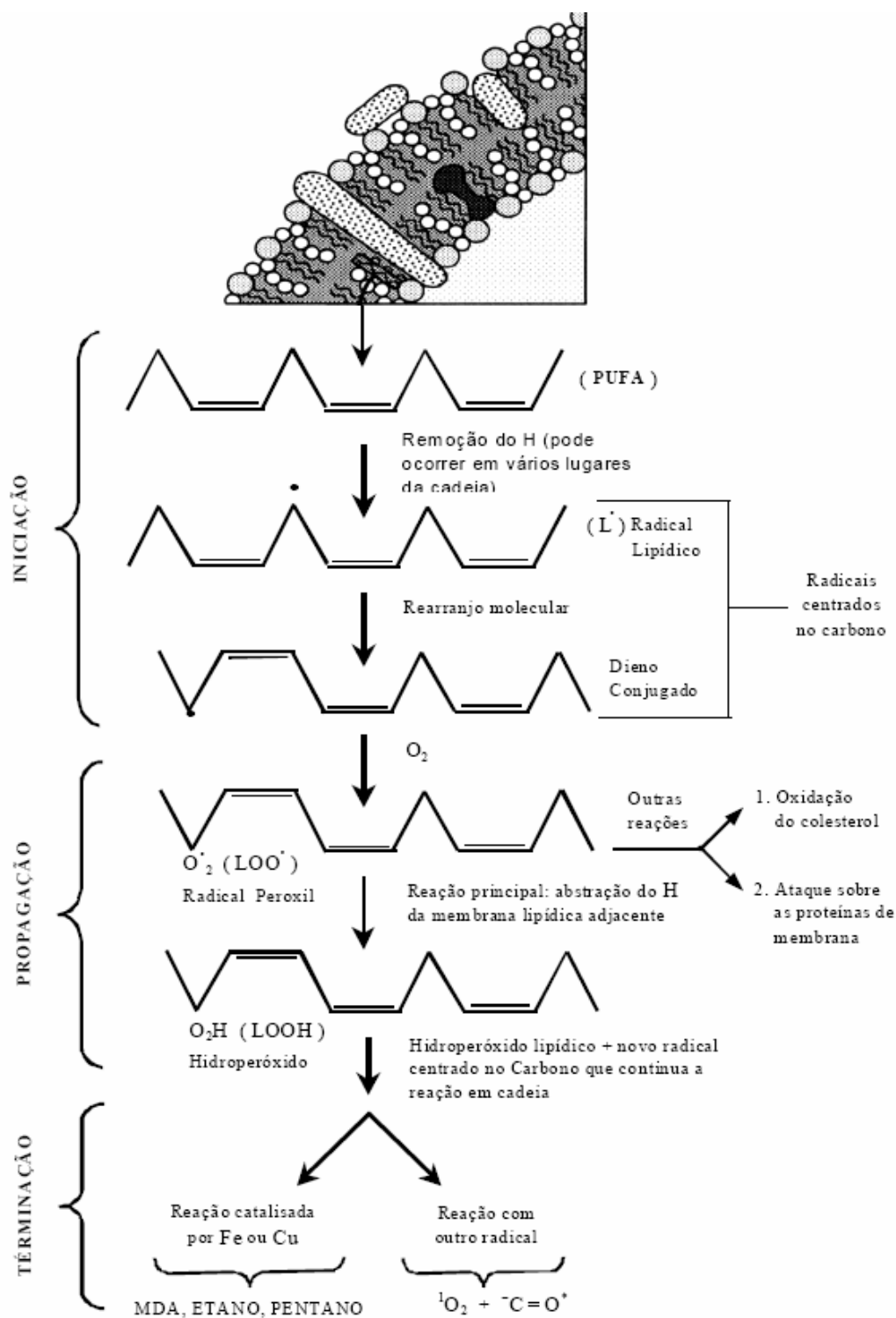


Figura 18: Representação esquemática da reação da LPO (modificado de Halliwell & Gutteridge, 1999).

Os dados em sangue, ao longo das três semanas, mostram o balanço sistêmico das medidas feitas, SOD, CAT e Nitritos + Nitratos, nos diferentes tempos e como o organismo vai se moldando frente à progressão da doença.

O estudo de Ito et al (2000) demonstrou que a hipertrofia cardíaca em modelo experimental de única dose de MCT (60mg/kg) em ratos se instala na segunda e terceira semanas. O que pudemos notar é que, sistemicamente, há grandes alterações nos parâmetros analisados da segunda para a terceira semana principalmente. Analisando os ratos tratados com MCT, há queda na catalase na segunda e terceira semanas nos ratos que receberam água, enquanto nos ratos tratados com suco houve um pico desta enzima na segunda semana com subsequente queda na terceira semana. A atividade da SOD foi sempre mantida alta em MCT e aumentou em S + MCT apenas na terceira semana. Os níveis de nitritos e nitratos apresentaram comportamento oposto nos dois grupos com hipertensão pulmonar. Enquanto houve um pico nestes metabólitos na segunda semana no grupo MCT com subsequente diminuição nos mesmos na terceira semana, o grupo S + MCT tinha esses metabólitos altos na primeira semana, decaindo na segunda semana e voltando a aumentar na terceira semana. Os resultados mostram que o organismo se adapta de maneira diferente nos diferentes tempos e, com a administração de suco, a resposta produzida sistemicamente também difere.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com dados obtidos em outros estudos onde o uso de flavonóides já foi associado com diminuição de risco para várias doenças como doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias e diabetes, por exemplo (González-Gallego et al, 2007, Kar et al , 2006, Dias et al, 2005). Esses efeitos podem ser em parte por suas propriedades antioxidantes de reduzir o estresse oxidativo (Dias et al, 2005, Rice-Evans, Miller & Paganga, 1996), porém os

flavonóides também aumentam a expressão de NOS, modulando a produção de NO (Rathel et al, 2007, Dias et al, 2005), podendo exercer sua função benéfica por atuar também sobre o metabolismo do NO.

Até onde sabemos, até a presente data, nenhum outro estudo havia investigado os efeitos da administração crônica de suco de uva com intuito de observar a modulação do estresse oxidativo e do NO em tecido pulmonar neste modelo experimental de MCT.

Com o avanço terapêutico para tratamento na hipertensão arterial pulmonar, os novos medicamentos existentes são bastante caros e baseiam-se no aumento da biodisponibilidade do NO para exercer seu papel vasodilatador ou na diminuição de fatores vasoconstritores (Meyer et al, 2004).

O suco de uva, quando parte de uma dieta saudável, não tem contra-indicações e interfere nestes mesmos fatores que dão base à terapia medicamentosa, podendo participar como nova proposta coadjuvante na terapia ou contribuir para a prevenção da doença quando precocemente se faz o diagnóstico genético para o gene defeituoso.

Almejamos poder contribuir para diminuição de custos, uma vez que o suco poderia ajudar na diminuição da dose medicamentosa ou prevenir o aparecimento da doença em indivíduos predispostos, o que evitaria aposentadorias precoces que ocorrem na presença da doença.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, o modelo de monocrotalina para indução da hipertensão pulmonar foi devidamente reproduzido neste estudo e a administração de suco de uva integral mostrou-se eficiente na atenuação dos danos causados por esta droga. Além disso, a alta palatabilidade da bebida que pode ser consumida por adultos e crianças favorece seu uso e os dados apontam para sua importância no tratamento preventivo. O suco de uva utilizado neste estudo vem como uma nova proposta preventiva e terapêutica coadjuvante no tratamento da hipertensão pulmonar, com potencial de reduzir o risco de outras doenças crônicas também associadas ao estresse oxidativo e disfunção na produção de NO.

8. PERSPECTIVAS

Os parâmetros analisados neste estudo nos dão uma visão limitada dos mecanismos envolvidos no processo que envolve a ação do suco de uva na modulação da hipertensão pulmonar em se tratando de estresse oxidativo e produção de óxido nítrico. Para fazer afirmações mais definitivas, seria necessário quantificar a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio no tecido pulmonar, bem como avaliar a atividade da NOS, o que são perspectivas futuras de trabalho.

Sabemos também que os mecanismos de ação dos flavonóides são mais complexos do que a simples atuação como antioxidantes. São perspectivas de futuros estudos analisar as rotas de sinalização intracelulares que podem estar envolvidas nos mecanismos protetores, comparando sua ação em diferentes estágios de progressão da insuficiência cardíaca como consequência da hipertensão pulmonar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe K, Shimokawa H, Morikawa K, Uwatoku T, Oi K, Matsumoto Y, Hattori T, Nakashima Y, Kaibuchi K, Sueishi K, Takeshita A: Longterm treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. *Circ Res* 2004; 94: 385–393.

Aebi H: Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-126, 1984

Albers AR, Varghese S, Vitseva O, Vita JA, Freedman JE. The anti-inflammatory effects of purple grape juice consumption in subjects with stable coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:e179–80.

Aldini G, Carini M, Piccoli A, Rossoni G, Facino RM. Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection. *Life Sci* 2003;73:2883–98.

Andronowska A, Waogonsowska B, Calstrokka J, and Doboszynacuteska T. Localization and correlation between NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase isoforms in the porcine uterus during the estrous cycle. *Cell and Tissue Research*. 2005 August; 321 (2): 243-250.

Anselm,E; Chataigneau,M; Ndiaye,M;Chataigneau,T;Schini-Kerth,VB. Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS. *Cardiovascular Research* 2007; 73: 404–413

Archer O, Rich S. Primary pulmonary hypertension: a vascular biology and translational research "Work in progress". *Circulation*. 2000;102(22):2781-91. Review.

Barnard MJ, Linter SPK. Wine and coronary heart disease. *Lancet* 1992; 340 : 313-4.

Behnke RH et al. Primary prevention of pulmonary heart disease. *J Am Osteopath Assoc* 69: 1139-1146, 1970.

Bernardis, L.L.; Patterson, B.D. Correlation between "Lee Index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J.Endocr.* 40:527-528, 1968.

Brennan LA, Wedgwood S, Black SM. The overexpression catalase reduces NO-mediated inhibition of endothelial NO synthase. *IUBMB Life*. 2002 Nov;54(5):261-5.

Campbell AI, Kuliszewski MA, Stewart DJ. Cell-based gene transfer to the pulmonary vasculature: endothelial nitric oxide synthase overexpression inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;21:567–575.

Campbell AI, Zhao Y, Sandhu R, Stewart DJ. Cell-based gene transfer of vascular endothelial growth factor attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 2001;104:2242–2248.

Cheng, W; Oike, M; Hirakawa, M; Ohnaka, K; Koyama, T; Ito, Y. Excess L-arginine restores endothelium-dependent relaxation impaired by monocrotaline pyrrole. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207:187-194, 2005.

Christofidou-Solomidou, M and Muzykantov, VR. Antioxidant strategies in Respiratory Medicine. *Treat Respir Med*. 2006;5(1):47-78

Chou EJ, Keevil JG, Aeschlimann S, Wiebe DA, Folts JD, Stein JH. Effect of ingestion of purple grape juice on endothelial function in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2001;88:553–5.

Coggins, MP and Bloch, KD. Nitric Oxide in the Pulmonary Vasculature. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2007;27:1877-85.

Comini, L; Bachetti, T; Gaia, G; Pasini, E; Agnoletti, L; Pepi, P; Ceconi, C; Curello, S; Ferrari, R. Aorta and Skeletal Muscle NO Synthase Expression in Experimental Heart Failure. *J Mol Cell Cardiol*, 28: 2241-2248, 1996.

D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med*. 1991;115(5):343-9.

Dhalla AK, Singal PK: Antioxidant changes in hypertrophied and failing guinea pig hearts. *Am J Physiol* 266: H1280–H1285, 1994

Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, González-Gallego J. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr.* 2005 Oct;135(10):2299-304.

Dröge, W; Free Radical in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Review*, 82:47-95, 2002.

Durak I, Avci A, Kacmaz M, et al. Comparison of antioxidant potential of red wine, white wine, grape juice and alcohol. *Curr Med Res Opin* 1999;15:316–20.

Fagan KA, Oka M, Bauer NR, Gebb SA, Ivy DD, Morris KG, McMurtry IF: Attenuation of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction and hypoxic pulmonary hypertension in mice by inhibition of Rho-kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287:L656–L664.

Farahmand F, Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental Cor Pulmonale. *Mol Cell Biochem.* 260: 21-9. 2004

Freedman JE, Parker 3rd C, Li L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V, et al. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation* 2001;103:2792–8.

Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1995;333:214–21.

Goldim, J.R. & Raimundo M.M. *Pesquisa em saúde e direito dos animais* 2ª ed. HCPA, Porto Alegre, RS, 1997.

Gonzalez-Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart and muscle. *Free Rad Biol Med*. 1991; 10: 41–7.

González-Gallego J, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr Hosp*. 2007 May-Jun;22(3):287-93.

Granger, D.L.; Anstey, N.M. Miller, W.C; Weinberg, J.B. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods in Enzymology*, 301: 58-61, 1999.

Gurr MI. Wine and coronary heart disease. *Lancet* 1992; 340 : 313.

Halliwell, B & Gutteridge, JMC. *Free radicals in biology and medicine*, Oxford, 3th edition, Oxford University Press, 1999.

Halliwell, B & Gutteridge, JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Methods Enzymol.*, v.186, p. 1, 1990.

Hart, M C. Nitric Oxide in Adult Lung Disease. *Chest* 1999;115:1407-1417

Hessel, MHM; Steendijk, P; Adel, BD; Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006.

Hill MF & Singal PK: Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol* 148: 291–300, 1996

Hironaka E, Hongo M, Sakai A, Mawatari E, Terasawa F, Okumura N, Yamazaki A, Ushiyama Y, Yazaki Y, Kinoshita O: Serotonin receptor antagonist inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension and prolongs survival in rats. *Cardiovasc Res* 2003; 60: 692– 699.

Hu JP, CalommeM, Lasure A, De Bruyne T, Pieters L, Vlietinck A, et al. Structure-activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity. *Biol Trace Elem Res* 1995;47:327–31.

Irigoyen, M C; Paulini, J; Florest, J; Flues, K; Bertagnoli, M; Moreira, E D; Colombo, F C; Belló-Klein, A; Angelis, K. Exercise training improves baroreflex sensitivity

associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. . Hypertension, v. 46, n. 04, p. 998-1003, 2005.

Ito KM, Sato M; Ushijima K, Nakai M, Ito K. Am J Physiol Heart Circ Physiol 279: H1786–H1795, 2000.

Jackson, RS. Wine Science. Principles and applications. Canada: Ed. Academic Press. 1994, 474p

Jasmin, J.F; Cernacek, P. and Dupuis, J. Activation of the right ventricular endothelin (ET) system in the monocrotaline model of pulmonary hypertension: response to chronic ETA receptor blockade. Clinical Science. 105, 647-653, 2003.

Kar P, Laight D, Shaw KM, Cummings MH. Flavonoid-rich grapeseed extracts: a new approach in high cardiovascular risk patients? Int J Clin Pract. 2006 Nov;60(11):1484-92.

Kay JM, Keane PM, Suyama KL, Gauthier D. Angiotensin converting enzyme activity and evolution of pulmonary vascular disease in rats with monocrotaline pulmonary hypertension. Thorax 37: 198-204, 1982.

Klein D, Kern RM, Sokol RZ. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. Biochem Mol Biol 36: 1, 1995

Laemmli V: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophageT4. *Nature* 227: 680-685, 1970

Lin JK, Chen PC, Ho CT, Lin-Shiau SY. Inhibition of xanthine oxidase and suppression of intracellular reactive oxygen species in HL-60 cells by theaflavin-3,3'-digallate, (-)-epigallocatechin-3-gallate, and propyl gallate. *J Agric Food Chem* 2000;48:2736–43.

Lindsay DG, Clifford MN. Introduction to NEODIET. *J Sci Food Agricult* 2000; 80: 793–4

Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S: Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadrimycin in mice. *Tumori* 71: 241–249, 1985

Lovoulos C, Tittle S, Goldstein L, Austin DJ, Singh S, Rocco E, Keane J, Tang P, Kopf GS, Elefteriades JA. Right ventricle-sparing heart transplantation effective against iatrogenic pulmonary hypertension. *J Heart Lung Transplant*. 2004 Feb;23(2):236-41.

Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randall R: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275, 1951

Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, Lane KB, Morgan NV, Wheeler L, et al. BMPR2 haploinsufficiency as the inherited molecular mechanism for primary pulmonary hypertension. *Am J Hum Genet.* 2001; 68(1):92-102.

Macnair A. Wine and coronary heart disease. *Lancet* 1992; 340:314.

Macnee W. The clinical importance of right ventricular function in pulmonary hypertension. In: Weir EK; Archer SL & Reeves JT, eds. *The diagnosis and treatment of pulmonary hypertension.* Futura, New York, p. 13-40, 1992.

Malcon C, Achaval M, Komlos F, et al. GMP protects against quinolinic-acid induced loss of NADPH-diaphorase-positive cells in the rat striatum. *Neuroscience Letters* 1997, 225 :145-148

Mannervik, B. & Gluthemberg, C. Glutathione Transferase. *Methods in Enzymology.* 77:231-235, 1981.

Marklund S: Pyrogallol autooxidation. In Greenwald RA (ed) *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* CRC, Press Boca Raton, FL: 243-247, 1985

Marks, DB; Marks, AD & Smith, CM. Oxygen Metabolism and Oxygen Toxicity. In: *Basic Medical Biochemistry*, Baltimore: Williams & Wilkins, 1996.

Mazza, G; Fukumoto, L; Delaquis, P et al. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *J. Agric. Food Chem.* v.47, n.10, p. 4009-4017, 1999.

Meyer, GMB; Moraes BG; Puchaslki, M; Camargo, J. Hipertensão pulmonar: avanços terapêuticos. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul - Ano XIII nº 01 Jan/FevMar/Abr 2004*

Nestle M. Wine and coronary heart disease. *Lancet* 1992; 340 : 314-5.

Noroozi. M, Angerson, W.J, Lean. M.E.J. Effects of flavonoids and Vitamin C on oxidative damage to human lymphocytes. *Am. J. Clin Nutr*; 67 : 1210-8, 1998.

O'Byrne,DJ; SDevaraj,S; Grundy, SM and Jialal,I. Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoids and -tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults *Am J Clin Nutr* 2002;76:1367-74.

Okayama N, Kevil CG, Correia L, et al: Nitric oxide enhances hydrogen peroxide-mediated endothelial permeability in vitro. *Am J Physiol* 1997; 273: C1581-1587.

Osman HE, Maalej N, Shanmuganayagam D, Folts JD. Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys. *J Nutr.* 1998 Dec;128(12):2307-12.

Ota JS & Pereira CAC. Cor pulmonale. Medicina, Ribeirão Preto, 31: 241-246, abr./jun. 1998.

Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, et al. Reduced hypoxic pulmonary vascular remodeling by nitric oxide from the endothelium. Hypertension 2001;37:322-7.

Palace VP, Hill MF, Farahmand F, Singal PK: Mobilization of antioxidant vitamin pools and hemodynamic function after myocardial infarction.

Circulation 99: 121-126, 1999

Pan LC, Wilson DW, Lame MW, Jones AD, Segal L HJ. Cor pulmonale is caused by monocrotaline and dehydromonocrotaline, but not by glutathione or cysteine conjugates of dihydropyrrrolizine. Toxicol. Appl. Pharmacol. 118: 87-97, 1993.

Park YK, Kim JS, Kang MH. Concord grape juice supplementation reduces blood pressure in Korean hypertensive men: double-blind, placebo controlled intervention trial. Biofactors 2004;22:145-7.

Paula Santos S. O paradoxo francês. Revista do Vinho 1992; 33:14.

Paula Santos S. O Vinho e suas circunstâncias. Editora Senac. 2002

Rathel TR, Samtleben R, Vollmar AM, Dirsch VM. Activation of endothelial nitric oxide synthase by red wine polyphenols: impact of grape cultivars, growing area and the vinification process. J Hypertens. 2007 Mar;25(3):541-9.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999 May;26(9-10):1231-7.

Renaud S, De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the french paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992; 339 : 1523-6.

Repetto, MG & Llesuy, SF. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 35, p. 523-534, 2002.

Rezenti AD; McClement JH & Litt BD. The veterans administration cooperative study of pulmonary function III. Mortality in relation to respiratory function in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med* 41: 115-119, 1996.

Rice-Evans C.A, Miller N. J & Paganda G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Reviews*. 2(4), 1997

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:933-56

Rice-Evans, C. Flavonoid Antioxidants. *Current Medical Chemistry* 2001, 8, 797-807

Rich S, ed. Primary pulmonary hypertension. Executive Summary from the World Symposium. Primary Pulmonary Hypertension. France, 1998. <http://www.who.int/ncd/cvd/pph-htm>>.

Rich S, Rubin L, Walker AM, Schneeweiss S, Abenheim L. Anorexigens and pulmonary hypertension in the United States: results from the surveillance of North American pulmonary hypertension. *Chest*. 2000;117(3):870-4.

Rich SDR, Dantzker SM, Ayres EH, Bergofsky BH, Brundage KM, Detre AP, et al. Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann Intern Med*. 1987;107(2):216-23.

Rodeheffer R.J. Lerman. Increased plasma concentrations of endothelin in congestive heart failure in humans. *Mayo Clin Proc*, 67:719-724, 1992.

Rubin LJ. Diagnosis and management of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2004;126(1 Suppl):7S-10S.

Rubin, L. ACCP consensus statement: primary pulmonary hypertension. *Chest* 104, 236–250 (1993).

Sanchez-Moreno, C. Larrauri JA, Saura-Calixto A. (1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric* 76, 270-276.

Sato M, Maulik G, Ray PS, Bagchi D, Das DK. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1289–97.

Segall JJ. Wine and coronary heart disease. *Lancet* 1992; 340 : 313.

Seyoum A, Asres K, El-Fiky FK. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*. 2006 Sep;67(18):2058-70.

Singal P, K. Khaper, N. Belló-Klein, A. and Bhayana, M. Oxidative stress in congestive heart failure. *Current Cardiology Reports; Heart Failure* 2:206-211, 2000.

Singal, PK; Khaper, N; Palace, V; Kumar, D. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovascular Research*, 40:426-432, 1998.

Singleton, V. L.; Rossi, Joseph A., Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* (1965), 16(3), 144-58. English.

Stein, JH; Keevil, MD; Wiebe, DA; Purple GrapeJuice Improves Endothelial Function and Reduces the Suscetibility of LDL Cholesterol to Oxidation in Patient With Coronary Artery Disease. *Circulation*, 100:1050-1055, 1999.

Takahara, A; Sugiyama, A; Honsho, S. The Endothelium-Dependent Vasodilator Action of a New Beverage Made of Red Wine Vinegar and Grape Juice. *Biol Pharm Bull*, 28(4) 754-756, 2005.

Todorovich-Hunter L, Dodo H, Ye C, Mc Cready L, Keeley FW, Rabinovich M. Increased pulmonary artery elastolytic activity in adult rats with monocrotaline-induced progressive hypertensive pulmonary vascular disease compared with infant rats with nonprogressive disease. *Am. Ver. Respir. Dis.* 146: 213-223, 1992

Travacio, M.; Polo, J.M. y Llesuy, S. (2000) *Toxicology* 150: 137-146.

Tsutsui, H. Mitochondrial Oxidative Stress and Heart Failure. *Internal Medicine*, x:809-813, 2006.

Valtschanoff JG, Weinberg RJ, Rustioni A. 1992. NADPH diaphorase in the spinal cord of rats. *J Comp Neurol* 321: 209-222.

Wallerath, T; Poleo, D; Li, H. Red Wine Increase the Expression of Human Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Journal of the American College of Cardiology*, 41:471-8, 2003.

Wang, YK & Huang, ZQ. Protective effects of icariin on human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂ in vitro. *Pharmacological Research*, 52:174-182, 2005.

Werchan PM, Summer WR, Gerdes AM, McDonough KH. Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol.* 1989 May;256(5 Pt 2):H1328-36

Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med.* 2004; 36: 838-49

Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Lane MW, Estep JE, Morin D. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1992;22:307–25

World Health Organization. Chronic cor pulmonale. A report of the expert committee. *Circulation* 2: 594-598, 1963.

Yagi K. (1976) A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* 15: 212-216.

Yan, CC; Huxtable, RY. Effects of Monocrotaline, a Pyrrolizidine Alkaloid, on Glutathione Metabolism in the Rat. *Biochemical Pharmacology.* 51: 375-379, 1996.

Ying CJ, Xu JW, Ikeda K, Takahashi K, Nara Y, Yamori Y. Tea polyphenols regulate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase subunit expression and ameliorate angiotensin II-induced hyperpermeability in endothelial cells. *Hypertens Res* 2003;26:823–8.

Yu, P.B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*. 74(1):139–162, 1994.

Zenebe, W; Pechánová, O. Red Wine Polyphenols Induce Vasorelaxation by Increased Nitric Oxide Bioactivity. *Physiol Res*, 52: 425-432, 2003.

Zhao YD, Campbell AI, Robb M, Ng D, Stewart DJ: Protective role of angiotensin-1 in experimental pulmonary hypertension. *Circ Res* 2003; 92: 984–991.

APÊNDICE – ARTIGO A SER SUBMETIDO

MODULATION OF MONOCROTALINE–INDUCED PULMONARY HYPERTENSION BY GRAPE JUICE – ROLE OF NITRIC OXIDE AND THE OXIDATIVE STRESS

Lehenbauer-Lüdke, AR ¹, Caron-Lienert, RS ¹; Mosele, F ¹; Fernandes, TRG ¹; Ribeiro, MF ²; Partata, W ³; Llesuy, S ⁴; Belló-Klein, A¹.

¹Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS- Brasil.

²Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS- Brasil.

³Laboratório de Neurobiologia Comparada, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS- Brasil.

⁴Departamento de Química Analítica y Fisicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Programa de Radicales Libres, PRALIB, Buenos Aires, Argentina.

ABSTRACT

Administration of monocrotaline (MCT) for development of *Cor pulmonale* is an experimental model widely applied to study pulmonary hypertension and selective right ventricular hypertrophy. *Cor pulmonale* is associated with oxidative stress and NO impairment. The ingestion of polyphenolics compounds, found in grape juice (GJ), have been related to chronic diseases protection for its antioxidant role. Thus, this study tested the hypothesis that increasement of dietary antioxidant levels by means GJ could modulate lung dysfunction induced by MCT in terms of oxidative stress and NO expression impairment. Just-weaned male Wistar rats were treated during 6 weeks since weaning. A single injection of MCT (60 mg/kg body weight i.p.) or equal

volume of saline was administered in the third week of the experimental protocol, water or GJ (10mL/kg/day) were administered throughout the protocol by gavage. Groups of animals (n=6/group): Water Control (WC) – received water and saline injection, Water Monocrotaline (WMCT) – received water and MCT injection, Grape Juice Control (GJC) – received GJ and saline injection, and Grape Juice Monocrotaline (GJMCT) – received GJ and MCT injection. Animals were assessed hemodynamically 21 days after MCT or saline injection to recording right ventricular end diastolic pressure (RVEDP), right ventricular systolic pressure (RVSP) and mean arterial pressure. After cervical dislocation, heart and lung morphometry was performed. Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation (LPO) by chemiluminescence (CL) and western blot analysis of eNOS expression were measured in lung homogenates. In addition, lung tissue was prepared to NADPH diaphorase histochemistry reaction. Administration of GJ promoted a reduction in pulmonary congestion and improvement in cardiac function, whereas did not prevent right ventricular hypertrophy in MCT treated rats. Antioxidants enzymes were found to be increased in lung of MCT group to compensate lipid oxidative damage, while grape juice minimizes lipid damage in lung, reducing oxidative stress. Grape juice treatment could also inhibit impairment of lung eNOS protein expression in MCT treated rats. Grape juice may prove to be preventive and therapeutic potential to pulmonary hypertension management.

INTRODUCTION

Monocrotaline (MCT) is a pyrrolizidine alkaloid present in a variety of plant sources worldwide, most often in the seeds of *Crotalaria spectabilis* (Smith & Culvenor, 1981). A single i.p. injection (60-90 mg/Kg) of MCT in rats leads to a sustained elevation of pulmonary pressure and right ventricular hypertrophy in the subsequent 2 to 3 weeks with clinical features that resemble human idiopathic pulmonary hypertension (Ghodsí & Will, 1981; Jasmin et al 2003). Pulmonary vascular remodeling following administration of MCT appears to be an important manifestation characterized by endothelial degeneration, hypertrophy of medial smooth muscle followed by subsequent thickening of the medial layer (Wilson et al 1992; Wilson et al 1989). The pulmonary arterial hypertension that results in right

ventricular enlargement (hypertrophy and/or dilatation) and may lead with time to right heart failure is defined as *Cor Pulmonale* (Weitzenblum, 2003).

MCT-induced *Cor Pulmonale* exhibits various alterations in the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) leading to impairment of nitric oxide-mediated signaling (Nakazawa et al 1999; Resta et al 1997). Nitric oxide (NO) is a free radical well recognized for its involvement in diverse biological processes, including vasodilation, bronchodilation, neurotransmission, tumor surveillance, antimicrobial defense and regulation of inflammatory-immune processes (Moncada et al, 1991; Furchgott et al, 1990).

Lungs are very prone to oxidative stress. A relatively high O₂ level in the tissue facilitates production of reactive oxygen species (ROS). Pulmonary oxidative stress is involved in many disease conditions including acute lung injury/adult respiratory distress syndrome, hyperoxia, ischemia-reperfusion, sepsis, radiation injury, lung transplantation, chronic obstructive pulmonary disease, and inflammation (Christofidou-Solomidou & Muzykantov, 2006). It was already demonstrated the involvement of ROS in pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy and failure induced by MCT (Farahmand et al, 2004). Therefore, antioxidant therapy could be beneficial, avoiding diseases progression.

Consumption of foods rich in flavonoids is associated with a reduced risk of various chronic diseases (Hertog et al, 1995; Kar et al, 2006; González-Gallego et al, 2007). The protective benefits of dietary flavonoids may be due in part to their antioxidant properties and ability to reduce oxidative stress (Rice-Evans et al, 1996). Flavonoids also increase the expression of eNOS, modulating NO production (Leikert et al, 2002; Rathel et al, 2007).

Grape juice is a rich source of the antioxidant flavonoids catechin, epicatechin, quercetin, and anthocyanins (Rice-Evans et al, 1996). *In vitro* and *in vivo* studies have shown that grape juice has antioxidant potencial (Durak et al, 1999; O'Byrne et al, 2002).

As much as we concern, to date, no study has investigated the effects of chronic grape juice consumption on eNOS protein expression, antioxidant status and markers of oxidative damage to lipids in pulmonary tissue of MCT model, and to determine whether the benefits of this dietary beverage could be achieved. Thus, the aim of the present study was to test the effects of grape juice consumption in pulmonary tissue of MCT-treated rats. We tested the hypothesis that the increased

dietary antioxidant levels by means grape juice could modulate lung dysfunction induced by MCT in terms of oxidative stress and NO impairment.

MATERIALS AND METHODS

Concentrated red grape juice

The purple grape juice concentrate was purchased from Adega Casa de Madeira Ltda (Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brasil). It was prepared from natural purple grapes. As certified by the provider, the specifications of the purple grape juice concentrate were as follows: 26g of carbohydrate/100 mL, 1g of protein/100mL, 1g of total fat/100mL. The grape juice was bottled in 250-mL bottles and stored in refrigerator until it was given to the rats.

Total phenols were analyzed in the Departamento de Química Analítica y Fisicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires according to the Folin-Ciocalteu method (modified from Singleton and Rossi, 1965), using gallic acid as standard, and the result: total phenols - 0.43 g/100mL.

Two methods for the screening of antioxidant activity were used:

a) ABTS (Re R et al; 1999) which is based on decolorization that occurs when radical cation $ABTS^{*\cdot}$ is reduced to ABTS and analyses mostly hydrosoluble antioxidants (Re R et al; 1999). The assay was made up with ABTS+ and grape juice (at a dilution of 1:1 in water). The solution reaches an absorbance value at 734 nm. The results were expressed in milimolar ascorbic acid, using a relevant calibration curve.

b) DPPH method which is based on the reduction of free radical DPPH (Sánchez-Moreno,C et al, 1998), which leads to its decolorization, analyzing mostly liposoluble antioxidants. The presence of antioxidant leads to a loss of color in the reactive in methanol at a concentration of 0.025g/L. At this concentration, solution reaches an absorbance value at 515 nm. The reaction takes place when DPPH (0.025g/L) is mixed with sample (at a dilution of 1:1 in water). Results were expressed in milimolar ascorbic acid using the dose-response curve described by this substance.

Experimental design

Experiments were performed according to Ethics Committee from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. Male Wistar rats, just weaned (weighing 40 ± 5 g), were obtained from the Central Animal House from our university. They were housed in groups under standard laboratory conditions (controlled temperature and humidity, 12h light/dark cycle). They were treated during 6 weeks since-weaning. It was administered a single injection of MCT (60 mg/kg body weight i.p.) or equal volume of saline in the third week of the experimental protocol. Water or whole grape juice (10mL/kg/day) were administered throughout the protocol by gavage (Keevil, J G et al 2000). Grape juice was administered during the three weeks before inducing MCT as a preventive strategy. Standard rat chow and tap water were given *ad libitum* during the experimental protocol.

This protocol resulted in four groups (n=6-8/group): Control - received tap water and saline injection, Monocrotaline (MCT) - received tap water and MCT injection, Juice - received grape juice and saline injection, and Juice + Monocrotaline (J + MCT) - received grape juice and MCT injection.

MCT injection occurred 21 days after the beginning of treatment in the groups MCT and J + MCT (60 mg/Kg i.p.). This protocol was used because no mortality was seen at this time point (Shubat, PJ et al 1989). All the parameters analyzed were evaluated 21 days after MCT injection. At the end of treatment, the animals were catheterized for hemodynamic assessment and, after, were immediately sacrificed by cervical dislocation, for organs collection and tissue homogenization.

Morphometric analysis and tissue preparation

Three weeks after MCT administration, rats were sacrificed and heart, right lung and liver were rapidly excised and weighed in order to estimate the congestion in these organs in terms of wet weight of the organ to body weight ratio. The left lung was homogenized (1.15% w/v KCl and phenyl methyl sulphonyl fluoride PMSF 20 mmol/L) in Ultra-Turrax. The suspension was centrifuged at 600 g for 10 min at 0-4°C to remove the nuclei and cell debris [Llesuy et al, 1985] and supernatants were used for further analysis.

Hemodynamic measurement

Cardiac hemodynamics was assessed at the end of the experimental protocol. In brief, rats were anesthetized (ketamine 90 mg/Kg; xylazine 10 mg/Kg, i.p.) and the jugular vein was cannulated with a PE 50 catheter connected to a strain gauge transducer (Narco Biosystem Pulse Transducer RP-155, Houston, TX, USA) linked to a pressure amplifier (HP 8805C, Hewlett Packard, USA). Pressure readings were taken in a microcomputer equipped with an analogue-to-digital conversion board (Windaq 1 KHz sampling frequency, Dataq Instruments Inc., Akron, OH, USA). The catheter was advanced into right ventricle (RV) for recording the right ventricular systolic pressure (RVSP, mmHg), right ventricular end diastolic pressure (RVEDP, mmHg) and mean arterial pressure (MAP, mmHg).

NADPH diaphorase histochemistry

Since the three known nitric oxide synthase (NOS) isoforms (nNOS, eNOS and iNOS) possess NADPH-diaphorase (NADPH-d) activity, NADPH-d histochemistry was used as a commonly accepted procedure for NOS identification (Valtschanoff et al 1992). Another animals (n=4/group) were prepared to identification of NADPH-d histochemistry reaction.

Animals were anesthetized (ketamine 90 mg/kg; xylazine 10 mg/kg, i.p.) and perfused transcardially with saline solution followed by a fixative solution containing 4% paraformaldehyde in 0.1m/L phosphate buffer (pH 7.4). Lungs were quickly dissected out, posfixed in the same fixative solution for 4 hours at room temperature and cryoprotected by immersion in 15 and 30% sucrose solutions in phosphate buffer at 4°C. Coronal serial sections (50 µm) were obtained on a cryostat (Leitz Digital 1702) at -20°C and collected in gelatinized slides. These slides were incubated in 0.1mol/L phosphate buffer with 12µL Triton X-100 for 10 min and transferred to a freshly histochemical medium containing 0.5 mg/mL β-NADPH (Sigma) 0.2 mg/mL nitro blue tetrazolium (Sigma) and 0.2 mol/L phosphate buffer containing 12 µL Triton X-100. After pre-incubation at room temperature for 5 minutes, they were incubated at 37°C for 4 hours. The sections were washed in 0.1 mol/L phosphate buffer and dehydrated, cleared with xylene, covered with Entellan and coverslips.

Control reaction to NADPH histochemistry was performed by incubated sections after omission of NADPH. No reactivity was present in these sections.

Sections were examined and photographed with Nikon Optiphot-2 microscope equipped with a Nikon FX-35DX Camera.

Western Blot Analysis

Tissue homogenization, electrophoresis, and protein transference were performed as described elsewhere [Laemmli V]. Nitrocellulose membranes were processed for immunodetection using rabbit anti-eNOS polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The bound primary antibody was detected using donkey anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugate secondary antibody and membranes were revealed for chemiluminescence. The autorradiographs generated were quantitatively analyzed with an image densitometer (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences Europe, IT). The molecular weights of the bands were determined by reference to a standard molecular weight marker (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). The results from each membrane were normalized through Ponceau red method [Klein D, Kern RM, Sokol RZ].

Tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence

To determine lipid peroxidation (LPO), chemiluminescence (CL) was measured in a liquid scintillation counter in the out-of-coincidence mode (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer 1215, LKB – Produkter AB, Sweden). Measurements were started by the addition of tert-butyl hydroperoxide to lung homogenates and data expressed as counts per second per milligram of protein (cps/mg protein) [Gonzalez-Flecha B, Llesuy S, Boveris A.].

Determination of antioxidant enzyme activities

Superoxide dismutase (SOD) activity, expressed as units per milligram of protein, was based on the inhibition of superoxide radical reaction with pyrogallol [Marklund S]. Catalase (CAT) activity was determined by following the decrease in hydrogen peroxide (H₂O₂) absorbance at 240 nm. It was expressed as nanomol of H₂O₂ reduced per minute per milligram of protein [Aebi H].

Determination of protein concentration

Protein was measured by the method of Lowry [Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randall R], using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SD. To compare multiple groups, we used one way ANOVA with post hoc Student-Newmann-Keuls. The correlation between two variables was analyzed by Pearson's correlation. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Radical scavenging activity of grape juice

Radical scavenging activity of grape juice which demonstrated antioxidant capacity evaluated by ABTS was $90.33 \text{ mmol/L} \cdot 10^{-2} \text{ mL}$ and DPPH was $38.35 \text{ mmol/L} \cdot 10^{-2} \text{ mL}$ (both using ascorbic acid as standard).

Morphometric Parameters

Table 1 summarizes morphometric characteristics of the animals at the day they were sacrificed. There was 10% less body weight gain, resulting in a significantly lower final body weight in MCT compared to all other groups ($P < 0.05$), $247 \pm 5.95 \text{ g}$ in Control and $221.12 \pm 9.7 \text{ g}$ in MCT; whereas in J + MCT this difference of growth retardation was not observed ($249.95 \pm 8.16 \text{ g}$ in Juice and $235.95 \pm 8.97 \text{ g}$ in J + MCT). As expected, it was observed an increase about 35% in right ventricle (RV) mass in both MCT groups in relation to their respective controls, mean of 0.45 mg/g in control groups (Control and Juice) and 0.605 mg/g in MCT groups ($P < 0.05$). The increase in cardiac mass induced by MCT was due to right ventricle chamber.

Significant lung congestion was observed in MCT (70%) and J + MCT (40%) groups as compared to Control (2.74 ± 0.11 mg/g) and Juice (2.79 ± 0.27 mg/g), respectively. Treatment with grape juice reduced lung congestion by 15% in J + MCT when compared to MCT. Concerning liver congestion, no significant difference was observed among the groups ($P < 0.05$).

Hemodynamic evaluation of the right ventricle

Hemodynamic results are summarized in Table 1. It was observed right ventricular pressures elevation: RVEDP (by 14%) and RVSP (by 40%) in MCT as compared to Control which was 6.24 ± 0.35 mmHg and 29.82 ± 1.87 mmHg, respectively. Grape juice was able to prevent partially right ventricular dysfunction reducing by 6% RVEDP and 27% RVSP in GJMCT as compared to WMCT ($P < 0.05$). Mean arterial pressure was not influenced by treatments applied.

NADPH diaphorase activity

NADPH diaphorase (NADPH-d) positive reaction was found in lung of all experimental groups. The intensely staining for NADPH-d occurred in endothelium of capillaries and larger blood vessels of Control, MCT, Juice and J + MCT treated rats (Fig. 1 A-D). A faint staining was also seen in smooth muscle layer of these animals. In MCT group it was found an increase of this layer (Fig. 1 B), which was not observed in other groups.

Lung airway epithelial cells from bronchioles exhibited strong NADPH-d reaction in all experimental groups (Fig. 2 A-D). The smooth muscle layer of bronchi also showed faint staining, as well as in cells of the alveolar region of all animal groups.

Protein expression of eNOS

Lung protein concentration of eNOS analyzed by Western blot was about 20 % lower in MCT group (from 106.81 ± 5.37 relative units in Control to 81.95 ± 7.44 relative units in MCT) compared to all other groups. In J + MCT group eNOS concentration was preserved in such a way that no difference was found as

compared to its respective control (Figure 3). Protein levels of eNOS were negatively correlated with SOD and CL values ($r=-0.85$, $P<0.0002$ and $r=-0.80$, $P<0.001$, respectively).

Pulmonary lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities

Changes in oxidative damage to lipids and antioxidant enzyme activities are shown in Table 2. Lipid peroxidation (LPO) was significantly ($P<0.05$) enhanced in MCT (16389 ± 1179 cps/mg prot) group as compared to Control (14465 ± 2400 cps/mg prot). Grape juice administration resulted in reduction by 70% and 63% in LPO in Juice (4346 ± 439 cps/mg prot) and J + MCT (6023 ± 1088 cps/mg prot) as compared to their respective controls ($P<0.05$). It was also observed significantly increased LPO (by 38%) in J + MCT group compared to Juice.

In terms of antioxidant enzyme activities, it was observed that MCT enhances significantly CAT activity (about 42%) in MCT group (from 53.5 ± 8.6 pmol/mg prot in Control to 76.3 ± 9.5 pmol/mg prot in MCT). There was a significantly augment (by 48%) in both groups treated with grape juice comparing Control. CAT activity is elevated in Juice, and continues in the same level in J + MCT group, showing that grape juice activates the enzyme and MCT does not alter its activity. On the other hand, SOD activity is enhanced only in MCT group ($P<0.05$), from 6.37 ± 1.07 U/mg prot in Control to 7.16 ± 1.13 U/mg prot in MCT, while its activity was decreased in grape juice treated juice when compared to their controls.

DISCUSSION

The present findings indicate that whole grape juice used has a powerful antioxidant capacity demonstrated by ABTS and DPPH methods evaluating scavenger activities. Moreover, it promotes reduction of lipid peroxidation *in vivo* around three-fold. It was also demonstrated its capacity to modulate eNOS expression. These effects may involve several components of grape juice which includes total phenol content quantified.

The major outcome of this study was attenuation of right ventricular dysfunction and lung congestion induced by MCT and its association with less

pulmonary oxidative damage and maintenance of high nitric oxide bioavailability when grape juice was daily administered.

MCT model has been used to evaluate the effects of pulmonary hypertension on neointimal proliferation, ventricular hypertrophy, regulation of gene expression, neuroendocrine modulation, and hemodynamic changes [Werchan et al, 1989] to a better understanding the pathogenesis of human idiopathic pulmonary hypertension.

The well-known initial injuries result in pulmonary endothelial degeneration, hypertrophy of medial smooth muscle layer, and adventitial edema which result in augmentation of pulmonary vascular resistance and pressure overload to right ventricle [Wilson et al, 1992]. Our results on morphometric and hemodynamic parameters of MCT groups are in agreement with these findings, demonstrating that the experimental model was reproduced. The increase in muscular layer of arterioles only in MCT group also supports pulmonary hypertension model.

One of the mechanisms involved in the pathogenesis of heart failure in MCT model is oxidative stress [Farahmand et al, 2004]. In order to examine the role of oxidative stress in pulmonary hypertension and how grape juice could modulate its phenomenon we analyzed some of the most important primary enzymatic antioxidant defenses and a parameter of lipid damage. By augment of SOD and LPO in MCT group, we can suppose that an accumulation of superoxide anion is taking place and SOD is trying to detoxify this anion, since this enzyme acts under this substrate which can be generated by lipid peroxidation. The ability to increase levels of SOD is a defense mechanism used by cells in situations where inflammation and subsequent increases in ROS are likely [Wong et al, 1989] which was demonstrated in MCT group, probably to compensate damage. The exogenous antioxidants present in grape juice could act as hydrogen donors, as well as singlet oxygen and superoxide radical quenchers, thus reducing LPO chain reactions [Seyoum et al, 2006], this could help us to understand why SOD pulmonary activity in J + MCT was low. Protective effects of polyphenols, present in grape juice, might be explained by their ability to scavenge superoxide anions, peroxy radicals, hydroxyl radicals, and peroxynitrite [Hu et al, 1995; Sato et al, 1999; Aldini et al, 2003].

Alternatively, it was described that protective effect might also be due to the ability of polyphenols to inhibit the expression and the activity of pro-oxidant enzymes such as NADPH oxidase and xanthine oxidase, and to increase antioxidant enzymes such as catalase [Ying et al, 2003; Lin et al, 2000]. Interestingly, the present study

showed that catalase pulmonary activity was increased in MCT, JUICE and J + MCT, it appears probably that the rise was induced by different pathways in each experimental group. It was also seen that catalase expression is enhanced in endothelial cells, when tea polyphenols were administered, as a defense mechanism to avoid endothelial dysfunction caused by increased endothelial permeability involving oxygen reactive species such as H_2O_2 [Ying et al, 2003]. Other findings indicated that H_2O_2 levels were increased in response to NO and the scavenging of this oxygen reactive species may be useful to prevent endothelial damage and eNOS inhibition [Okayama et al, 1997; Brennan et al, 2002]. Our results in J + MCT showed that eNOS pulmonary expression levels and CAT pulmonary activity were maintained in same levels as JUICE groups, suggesting that MCT administration does not affect this pathway, which could be contributing to improvement of endothelial function.

Anselm et al, 2007 suggested that their findings for vasoprotective effect of polyphenols were due to a dual action: a moderate pro-oxidant action in endothelial cells to enhance vasoprotective mechanisms involving NO and endothelium-derived hyperpolarizing factor, and an antioxidant action in vascular smooth muscle cells and platelets. While there has been a major focus on the antioxidant properties, there is an emerging view that flavonoids, and their *in vivo* metabolites, do not act as conventional hydrogen-donating antioxidants but may exert modulatory actions in cells through actions at protein kinase and lipid kinase signalling pathways [Williams et al, 2004].

Clinical studies confirm that eNOS isoform is present in the endothelium of pulmonary vessels of healthy subjects but its expression is downregulated in patients with primary pulmonary hypertension. This suggests that pulmonary vasoconstriction and an increased smooth muscle layer in the pulmonary vessels, which are features of this disease, are due to impaired expression of eNOS [Giaid & Saleh, 1995].

It has been shown that overproduction of eNOS derived NO can inhibit, not only the increase in right ventricular systolic pressure associated with pulmonary hypertension, but also remodeling of the pulmonary vasculature and right ventricular hypertrophy induced by chronic hypoxia, suggesting a potential therapeutic role of overexpression of the eNOS pathway in pulmonary vascular endothelium [Ozaki et al, 2001].

Recently, studies of pulmonary hypertension in animal models have demonstrated that prevention or reversal of development of PH is associated with

restoration of endothelial NO synthase activity in various treatments [Abe et al, 2004; Fagan et al, 2004; Hironaka et al, 2003; Zhao et al, 2003]. Our results showed that grape juice administration augmented eNOS expression which suggests that the attenuation of MCT-induced pulmonary by grape juice may be, at least in part, related to the restoration of NO bioavailability. However, it is interesting that the NADPH-d reaction was similar localized in all experimental groups, although endothelial degeneration analysis could not be evaluated. The strong reaction in endothelium and epithelial airway cells support the thought that NO produced in this region contributed to less resistance of the lung.

In summary, the administration of grape juice appears to be important in attenuation of pulmonary hypertension, by improving cardiac function, reducing pulmonary congestion and lipid damage, and by upregulation of eNOS pulmonary expression. Once, it is a highly palatable beverage that can be consumed by both adults and children, which can demonstrate a preventive role. Grape juice may prove to be a new potential therapeutic agent for prevention and treatment of pulmonary hypertension, with potential to reduce the risks of other chronic diseases also associated with oxidative stress and NO impairment.

REFERENCES

1. Abe K, Shimokawa H, Morikawa K, Uwatoku T, Oi K, Matsumoto Y, Hattori T, Nakashima Y, Kaibuchi K, Sueishi K, Takeshita A: Longterm treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. *Circ Res* 2004; 94: 385–393.
2. Aebi H: Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-126, 1984
3. Aldini G, Carini M, Piccoli A, Rossoni G, Facino RM. Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection. *Life Sci* 2003;73:2883–98.
4. Anselm,E; Chataigneau,M; Ndiaye,M;Chataigneau,T;Schini-Kerth,VB. Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS. *Cardiovascular Research* 2007; 73: 404–413

5. Brennan LA, Wedgwood S, Black SM. The overexpression catalase reduces NO-mediated inhibition of endothelial NO synthase. *IUBMB Life*. 2002 Nov;54(5):261-5.
6. Christofidou-Solomidou, M and Muzykantov, VR. Antioxidant strategies in Respiratory Medicine. *Treat Respir Med*. 2006;5(1):47-78
7. Durak I, Avci A, Kacmaz M, et al. Comparison of antioxidant potential of red wine, white wine, grape juice and alcohol. *Curr Med Res Opin* 1999;15:316–20.
8. Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy S, Lissi EA. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch Biochem Biophys*. 2001; 388: 261-66.
9. Fagan KA, Oka M, Bauer NR, Gebb SA, Ivy DD, Morris KG, McMurtry IF: Attenuation of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction and hypoxic pulmonary hypertension in mice by inhibition of Rho-kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287:L656–L664.
10. Farahmand F, Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental Cor Pulmonale. *Mol Cell Biochem*. 260: 21-9. 2004
11. Furchgott RF, Jothianandan D, Freay AD. Endothelium-derived relaxing factor: some old and new findings. In: Moncada S, Higgs EA (eds.), *Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system*. Amsterdam, New York, Oxford: Excerpta Medica; 1990: 5-17.
12. Ghodsi F and Will, JA Changes in pulmonary structure and function induced by monocrotaline intoxication. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 240: H149-H155. 1981
13. Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1995;333:214–21.
14. Gonzalez-Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart and muscle. *Free Rad Biol Med*. 1991; 10: 41–7.
15. González-Gallego J, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr Hosp*. 2007 May-Jun;22(3):287-93.

16. Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. *Arch Intern Med* 1995;155:381–6
17. Hironaka E, Hongo M, Sakai A, Mawatari E, Terasawa F, Okumura N, Yamazaki A, Ushiyama Y, Yazaki Y, Kinoshita O: Serotonin receptor antagonist inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension and prolongs survival in rats. *Cardiovasc Res* 2003; 60: 692– 699.
18. Hu JP, Calomme M, Lasure A, De Bruyne T, Pieters L, Vlietinck A, et al. Structure-activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity. *Biol Trace Elem Res* 1995;47:327–31.
19. Jasmin JF, Cernacek P, Dupuis J. Activation of the right ventricular endothelin (ET) system in the monocrotaline model of pulmonary hypertension: response to chronic ETA receptor blockade. *Clin Sci (Lond)*. 2003 Dec;105(6):647-53.
20. Kar P, Laight D, Shaw KM, Cummings MH. Flavonoid-rich grape seed extracts: a new approach in high cardiovascular risk patients? *Int J Clin Pract*. 2006 Nov;60(11):1484-92.
21. Keevil, J G; Osman, H E; Reed, J D; Folts, J D. Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *The Journal of Nutrition*. 2000 Jan; 130(1): 53-6
22. Klein D, Kern RM, Sokol RZ. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Biochem Mol Biol* 36: 1, 1995
23. Laemmli V: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970
24. Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation*. 2002 Sep 24;106(13):1614-7.
25. Lin JK, Chen PC, Ho CT, Lin-Shiau SY. Inhibition of xanthine oxidase and suppression of intracellular reactive oxygen species in HL-60 cells by theaflavin-3,3'-digallate, (-)-epigallocatechin-3-gallate, and propyl gallate. *J Agric Food Chem* 2000;48:2736–43.

26. Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S: Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadrimycin in mice. *Tumori* 71: 241–249, 1985
27. Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randall R: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275, 1951
28. Marklund S: Pyrogallol autooxidation. In Greenwald RA (ed) *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* CRC, Press Boca Raton, FL: 243-247, 1985
29. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991, 43:109–142
30. Nakazawa H, Horii M, Ozaki H, Karaki H: Mechanisms underlying the impairment of endothelium-dependent relaxation in the pulmonary artery of monocrotaline induced pulmonary hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1098–1104;
31. O'Byrne, DJ; SDevaraj, S; Grundy, SM and Jialal, I. Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoids and α -tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults *Am J Clin Nutr* 2002;76:1367–74.
32. Okayama N, Kevil CG, Correia L, et al: Nitric oxide enhances hydrogen peroxide-mediated endothelial permeability in vitro. *Am J Physiol* 1997; 273: C1581–1587.1
33. Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, et al. Reduced hypoxic pulmonary vascular remodeling by nitric oxide from the endothelium. *Hypertension* 2001;37:322–7.
34. Rathel TR, Samtleben R, Vollmar AM, Dirsch VM. Activation of endothelial nitric oxide synthase by red wine polyphenols: impact of grape cultivars, growing area and the vinification process. *J Hypertens*. 2007 Mar;25(3):541-9.
35. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999 May;26(9-10):1231-7.
36. Resta TC, Gonzales RJ, Dail WG, Sanders TC, Walker BR: Selective upregulation of arterial endothelial nitric oxide synthase in pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1997; 272:H806–H813

37. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:933–56
38. Sanchez-Moreno, C. Et al. (1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric* 76, 270-276.
39. Sato M, Maulik G, Ray PS, Bagchi D, Das DK. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1289–97.
40. Seyoum A, Asres K, El-Fiky FK. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*. 2006 Sep;67(18):2058-70.
41. Shubat PJ, Hubbarà AK, Huxtable RI. Dose-response relationship in intoxication by the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. *J Toxicol Environ Health*. 1989; 28: 445-460.
42. Smith, LW and Culvenor, CC, Plant sources of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids. *J Nat Prod*. Mar-Apr;44(2):129-52.1981
43. Valtschanoff JG, Weinberg RJ, Rustioni A. 1992. NADPH diaphorase in the spinal cord of rats. *J Comp Neurol* 321: 209-222.
44. Weitzenblum E. Chronic cor pulmonale. *Heart*. 2003 Feb;89(2):225-30. Review. PMID: 12527688 [PubMed - indexed for MEDLINE]
45. Werchan PM, Summer WR, Gerdes AM, McDonough KH. Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 1989;256:H1328–36
46. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med*. 2004; 36: 838-49
47. Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Dunston SK. Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res*. 1989 Jul;38(1):57-80.
48. Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Lame MW, Estep JE, Morin D. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1992;22:307–25;
49. Wong GHW, Elwell JH, Oberley LW, Goeddel DV. Manganese superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* 58:923-931 (1989).

50. Ying CJ, Xu JW, Ikeda K, Takahashi K, Nara Y, Yamori Y. Tea polyphenols regulate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase subunit expression and ameliorate angiotensin II-induced hyperpermeability in endothelial cells. *Hypertens Res* 2003;26:823–8.
51. Zhao YD, Campbell AI, Robb M, Ng D, Stewart DJ: Protective role of angiotensin-1 in experimental pulmonary hypertension. *Circ Res* 2003; 92: 984–991.

Table 1. Morphometric and hemodynamic parameters from saline or MCT-treated rats (60mg/kg) at the third week of treatment, treated with tap water or grape juice.

Parameters	Groups			
	Control	MCT	Juice	J + MCT
BW (g)	247.83 ± 5.95	221.12 ± 9.7 ^{a d}	249.33 ± 8.16	235.95 ± 8.97
Heart /BW (mg/g)	2.47 ± 0.06	2.74 ± 0.11 ^a	2.46 ± 0.11	2.77 ± 0.15 ^c
RV /BW (mg/g)	0.44 ± 0.02	0.60 ± 0.04 ^a	0.46 ± 0.04	0.61 ± 0.06 ^c
LV+septum/BW (mg/g)	2.17 ± 0.15	2.16 ± 0.20	2.22 ± 0.18	2.20 ± 0.19
Liver / BW (mg/g)	41.75 ± 2.18	43.42 ± 2.92	41.86 ± 4.01	44.97 ± 3.45
Right Lung / BW (mg/g)	2.74 ± 0.11	4.66 ± 0.37 ^a	2.79 ± 0.27 ^b	3.95 ± 0.56 ^{b c}
RVEDP (mmHg)	6.24 ± 0.35	7.11 ± 0.46 ^a	5.86 ± 0.31	6.23 ± 0.34 ^b
RVSP (mmHg)	29.82 ± 1.87	41.31 ± 2.38 ^a	28.95 ± 2.51	36.86 ± 3.32 ^{b c}
MAP (mmHg)	119.71 ± 7.71	120.52 ± 13.80	105.12 ± 13.97	119.57 ± 8.23

Values are means ± SD, n=6-8/group. Control = treated with water and saline injection; MCT = treated with water and monocrotaline injection; Juice = treated with grape juice and saline injection, and J + MCT = treated with grape juice and monocrotaline injection. RV, right ventricle; LV, left ventricle; BW, body weight, RVEDP = Right ventricular end diastolic pressure, VDSP = right ventricular systolic pressure and MAP = mean arterial pressure. Liver/BW and LV+septum/BW were not influenced by MCT. **a** significantly different as compared to Control ($P < 0.05$) **b** significantly different as compared to MCT ($P < 0.05$) **c** significantly different as compared to Juice ($P < 0.05$) **d** significantly different as compared to J + MCT ($P < 0.05$)

Table 2. Oxidative stress parameters measured in lung tissue from saline or MCT-treated rats (60mg/kg) at the third week of treatment, treated with tap water or grape juice.

Parameters	Groups			
	Control	MCT	Juice	J + MCT
CL (cps/mg prot)	14465 ± 2400	16389 ± 1179 ^a	4346 ± 439 ^a	6023 ± 1088 ^{b c}
CAT (pmol/mg prot)	53.5 ± 8.6	76.3 ± 9.5 ^a	79.4 ± 4.9 ^a	78.4 ± 3.3 ^a
SOD (USOD/mg prot)	6.37 ± 1.07	7.16 ± 1.13 ^a	4.94 ± 0.83 ^a	4.43 ± 0.69 ^b

Values are means ± SD, n=6-8/group. Control = treated with water and saline injection; MCT = treated with water and monocrotaline injection; Juice = treated with grape juice and saline injection, and J + MCT = treated with grape juice and monocrotaline injection. CL = chemiluminescence; CAT = catalase enzyme activity, and SOD = superoxide dismutase enzyme activity. **a** significantly different as compared to Control ($P < 0.05$) **b** significantly different as compared to MCT ($P < 0.05$) **c** significantly different as compared to Juice ($P < 0.05$)

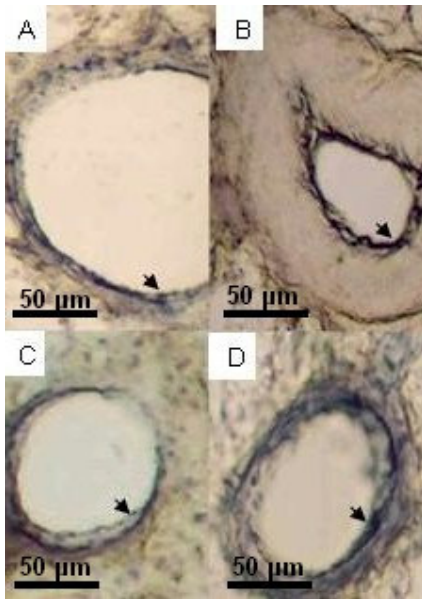
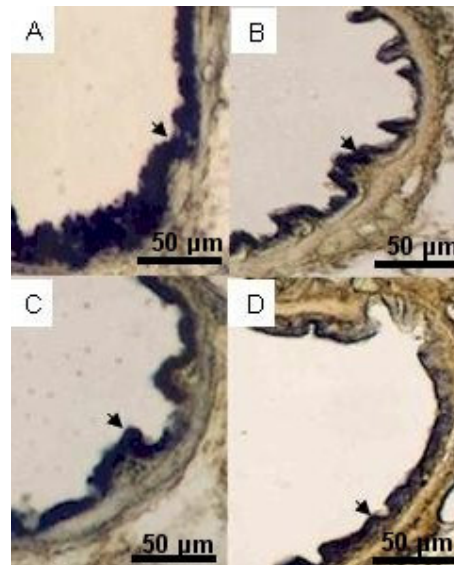


Figure 1 – NADPH diaphorase histochemistry reaction in the vasculature of rat lung treated with water and saline (A), water and monocrotaline (B), grape juice and saline (C) and grape juice and monocrotaline (D). Note the intense stain in the endothelial (arrows). A faint staining is seen in smooth muscle layer of larger arteries. This layer is more thick in (B). Bars = 50 µm

Figure 2 – NADPH diaphorase histochemistry reaction in airways of rat lung treated with water and saline (A), water and monocrotaline (B), grape juice and saline (C) and grape juice and monocrotaline (D). This reaction is strongly in epithelial cells (arrows). Bars = 50 µm



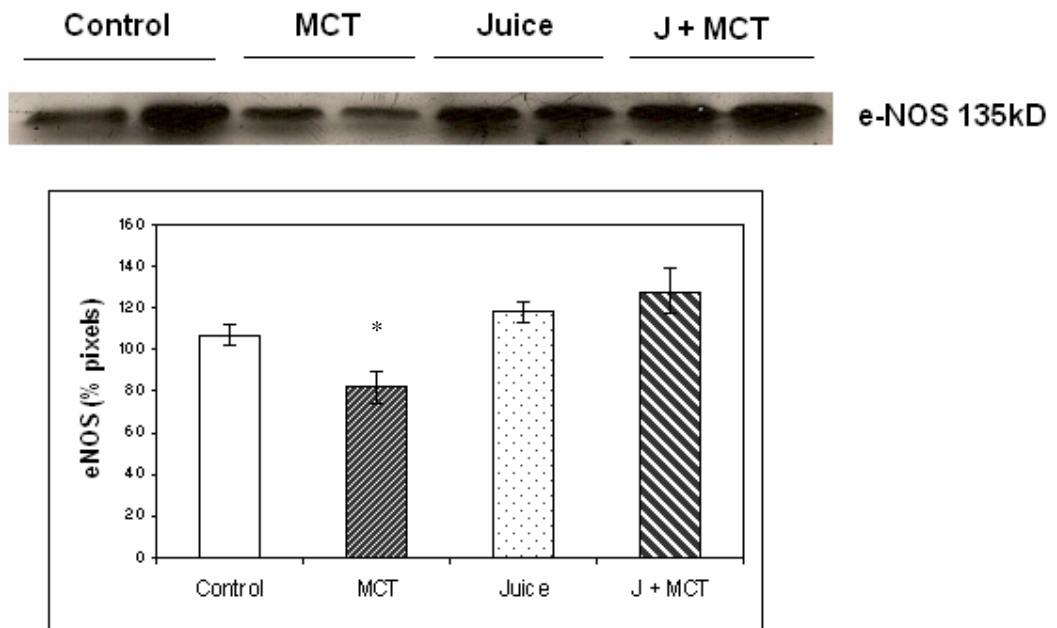


Figure 3: Western blot analysis in lung homogenates using eNOS antibody. Data as mean \pm SD from 3-4 animals in each group (one representative gel of two Western blot experiments, showing two bands for each experimental group).

* significantly different from Control, Juice and J + MCT ($P < 0.05$).