

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Efeitos da ovariectomia no estresse oxidativo em pulmão e ventrículo direito de ratas com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina

Rafaela Siqueira

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriane Belló-Klein

Porto Alegre

2015

Rafaela Siqueira

Efeitos da ovariectomia no estresse oxidativo em pulmão e ventrículo direito de ratas com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Orientadora: Dr^a. Adriane Belló-Klein

Porto Alegre

2015

“Nós somos aquilo que fazemos repetidamente. Excelência, então, não é um modo de agir, mas um hábito.”

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

À professora Adriane, pela orientação, incentivo, conhecimento, dedicação e pelas grandes lições diárias que me proporcionou.

Aos professores Maristela Padilha, Alex Sander Araújo, Susana Llessuy e Silvia Lacchini pelas contribuições e ensinamentos.

Aos professores da banca de defesa da tese, pela disponibilidade e contribuições.

Aos professores e funcionários do PPG Fisiologia.

A todos os colegas do laboratório de Fisiologia Cardiovascular, pelo apoio e convívio.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo incentivo financeiro.

Aos amigos queridos que de uma forma ou de outra contribuíram com sua força e estímulo para que eu conseguisse completar este percurso: Adriana, Alexandre, Amanda, Luciana e Tânia, agradeço a todos.

À Sibeles, pelo carinho, incentivo e amizade.

Ao Rafael, meu grande companheiro, pelo respeito, paciência, incentivo, auxílio e amor.

À minha família, pelo amor e apoio em todos os momentos: Mãe, Mec, Vovô, Vozinha (*in memoriam*), Renata, Roberta e meu amorzinho Franco.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, tornaram possível a realização deste trabalho.

A Deus e a São Judas Tadeu por estarem sempre presentes e guiando meus caminhos.

RESUMO

Neste estudo foi utilizado o modelo de hipertensão arterial pulmonar (HAP) induzida por monocrotalina (MCT), que mimetiza esta doença grave e progressiva, a qual tem início com o aumento da resistência pulmonar, com subsequente prejuízo da função ventricular direita. Sabe-se que o estresse oxidativo está envolvido na patogênese desta doença e que existe uma diferença de gênero na sua prevalência. No entanto, os mecanismos envolvidos nesta diferença não são claros. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o estresse oxidativo em pulmão e ventrículo direito de ratas Wistar ovariectomizadas ou não, na presença ou não da MCT. Para esse fim, foram realizados dois experimentos utilizando ratas ovariectomizadas ou com simulação deste procedimento, bem como, com indução ou não da HAP por dose única de MCT (60 mg/Kg i.p), avaliando parâmetros funcionais, morfométricos, bioquímicos e moleculares 21 dias após. Isto permitiu realizar a avaliação dos mecanismos relacionados ao objetivo desta pesquisa. No experimento I, referente ao pulmão, a ovariectomia produziu aumento do estresse oxidativo induzido pela MCT, visto que foi verificada elevação do dano oxidativo e aumentada produção de radical superóxido: inferida pelo desacoplamento da enzima óxido nítrico sintase e pelo acréscimo na atividade da superóxido dismutase. Além disso, a análise histológica mostrou que a interação entre a MCT e a ovariectomia determinou um pronunciado remodelamento neste grupo, conferido pelo aumento de infiltrado inflamatório e deposição de colágeno perivascular. No experimento II, referente ao ventrículo direito, foi observado que a ovariectomia não produziu um incremento do estresse oxidativo induzido pela MCT. Esta resposta concorda com o fato de não ter havido um aumento adicional da resistência vascular pulmonar e conseqüente alteração da função ventricular direita. É proposto que a adaptação das defesas antioxidantes não-clássicas heme oxigenase 1 e tioredoxina 1 contribuíram para esta preservação funcional através da ativação do receptor de estrogênio β . Desta forma, foi demonstrado que o insulto produzido pela MCT, relativo ao estresse oxidativo e a falta do estrogênio no pulmão, não foi capaz de gerar danos adicionais ao ventrículo direito, fato este que pode ser determinado pela proteção oferecida pelo sistema de defesa antioxidante induzido pelo estrogênio.

ABSTRACT

In this study, it was utilized the model of pulmonary arterial hypertension (PAH) induced by monocrotaline (MCT), that mimics this serious and progressive disease, which initiates with an increase in pulmonary resistance, and subsequent impairment of right ventricle function. It is known that oxidative stress is involved in the pathogenesis of this disease and that there is a gender difference in its prevalence. However, the mechanisms involved in this difference are still unclear. By this way, the aim of this study was to evaluate oxidative stress in lung and right ventricle of female Wistar rats ovariectomized or not, in the presence or absence of MCT. For this aim, it were performed two experiments using ovariectomized rats or with a simulation of this procedure, as well as with the induction or not of PAH by means a single dose of MCT (60 mg/kg i.p.), evaluating functional, morphometric, biochemical and molecular parameters 21 days after. This permitted to evaluate the mechanisms related to the objectives of this research. In the experiment I, related to lung, ovariectomy produced increase of the oxidative stress induced by MCT, since it was verified enhancement of oxidative damage and increased production of superoxide radical: inferred by the uncoupling of the nitric oxide synthase enzyme and by the elevation in the activity of superoxide dismutase. Besides that, histological analysis has shown that the interaction between MCT and ovariectomy determined a pronounced remodeling in this group, conferred by the increase in inflammatory infiltrate and perivascular collagen deposition. In the experiment II, related to right ventricle, it was observed that ovariectomy has not produced an increment in the oxidative stress induced by MCT. This answer agrees with the fact that it doesn't happened an additional increase in pulmonary vascular resistance and consequent alteration in the right ventricle function. It is proposed that the adaptation of the non-classic antioxidant defenses hemeoxygenase and thioredoxin has contributed to this functional preservation, through the activation of the estrogen receptor β . By this way, it was demonstrated that the insult produced by MCT, related to oxidative stress and lack of estrogen in lungs, it was not capable to produce additional damage to the right ventricle, fact that can be determined by the protection offered by antioxidant defense induced by estrogen.

LISTA DE ABREVIATURAS

•OH: radical hidroxil
3 β -HSD: 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase
AKT: proteína quinase B
CAT: catalase
CYP1B1: enzima citocromo P450 1B1
DC: débito cardíaco
DHEA: deidroepiandrosterona
DNA: ácido desoxirribonucleico
eNOS: óxido nítrico sintase endotelial
ERE: elemento responsivo ao estrogênio
ERNs: espécies reativas de nitrogênio
EROs: espécies reativas de oxigênio
ERs: receptores de estrogênio
ER- α : receptor de estrogênio α
ER- β : receptor de estrogênio β
ET-1: endotelina 1
FC: frequência cardíaca
GPER: receptor de estrogênio acoplado à proteína G
GPx: glutationala peroxidase
Grx: glutaredoxina
GSH: glutationala
GSSG: glutationala oxidada
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
HAP: hipertensão arterial pulmonar
HE: hematoxilina-eosina
HO-1: heme oxigenase
HOCl: ácido hipocloroso
HP: hipertensão pulmonar
HVD: hipertrofia do ventrículo direito
IC: insuficiência cardíaca
ICD: insuficiência cardíaca direita
MCT: monocrotalina
MyD88: gene 88 de resposta primária de diferenciação mielóide

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NFkB: factor nuclear kappa B
NO: óxido nítrico
NO[•]: radical óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintase
Nrf2: fator nuclear derivado de eritróide 2
O: ovariectomia
O₂^{•-}: ânion radical superóxido
OM: ovariectomia monocrotalina
ONOO⁻: peroxinitrito
PDFVD: pressão diastólica final do ventrículo direito
PI3-K: fosfatidilinositol-3-quinase
PmAP: pressão média da artéria pulmonar
Prx: peroxiredoxina
PSVD: pressão sistólica do ventrículo direito
QL: quimiluminescência
RNA: ácido ribonucleico
S: sham
SM: sham monocrotalina
SOD: superóxido dismutase
TAC: tempo de aceleração do fluxo da artéria pulmonar
TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TEJ: tempo de ejeção do fluxo pela artéria pulmonar
TLR4: receptor tipo Toll 4
Trx: tioredoxina
VD: ventrículo direito
VS: volume sistólico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem da <i>Crotalaria spectabilis</i>	16
Figura 2 - Redução do oxigênio molecular à água	26
Figura 3 – Grupos experimentais	35
Figura 4 - Desenho experimental do experimento I.....	38
Figura 5 - Desenho experimental do experimento II.....	39
Figura 6 - Atividade da NADPH oxidase no pulmão.....	51
Figura 7 - Expressão da SOD-1 por Western Blot em homogeneizado de pulmão...52	
Figura 8 - Atividade da SOD no pulmão.....	53
Figura 9 - Atividade da NOS no pulmão.....	54
Figura 10 - Nitritos totais no pulmão.....	55
Figura 11 - Concentração de H ₂ O ₂ em homogeneizado de pulmão.	56
Figura 12 - Atividade da CAT em homogeneizado de pulmão.	57
Figura 13 - Expressão da Prx VI por Western Blot em homogeneizado de pulmão. .58	
Figura 14 - Lipoperoxidação por TBARS no pulmão.	59
Figura 15 - Expressão do ER- α por Western Blot em homogeneizado de pulmão. ..60	
Figura 16 - Expressão do ER- β por Western Blot em homogeneizado de pulmão. ..61	
Figura 17 - Fotomicrografias representativas dos pulmões corados por hematoxilina-eosina (HE), 21 dias após indução da HAP por MCT.	62
Figura 18 - Fotomicrografias representativas dos pulmões corados para picrossirius, 21 dias após indução da HAP por MCT.	63
Figura 19 - Expressão do TLR4 por Western Blot em homogeneizado de pulmão...64	
Figura 20 - Expressão da MyD88 por Western Blot em homogeneizado de pulmão.	65
Figura 21 - Expressão do NF κ B por Western Blot em homogeneizado de pulmão...66	
Figura 22- Expressão da p-NF κ B por Western Blot em homogeneizado de pulmão.67	
Figura 23 - Expressão da p-NF κ B/NF κ B por Western Blot em homogeneizado de pulmão.	68
Figura 24 - Ecocardiografia representativa do fluxo pela artéria pulmonar 21 dias após administração de monocrotalina ou salina	70
Figura 25 - Oxidação a proteínas por carbonilas em homogeneizado de VD.	73
Figura 26 - Dano a lipídios por quimiluminescência em homogeneizado de VD.....	74
Figura 27 - Expressão da SOD-1 por Western Blot em homogeneizado de VD.	76
Figura 28 - Expressão da CAT por Western Blot em homogeneizado de VD.	77
Figura 29 - Expressão da GPx-1 por Western Blot em homogeneizado de VD.	77
Figura 30 - Expressão da eNOS por Western Blot em homogeneizado de VD.	78
Figura 31 - Expressão do Nrf2 por Western Blot em homogeneizado de VD.	79
Figura 32 - Expressão da HO-1 por Western Blot em homogeneizado de VD.....	80
Figura 33 - Expressão da Trx-1 por Western Blot em homogeneizado de VD.....	81
Figura 34 - Expressão da Prx VI por Western Blot em homogeneizado de VD.	82
Figura 35 - Expressão da Grx-1 por Western Blot em homogeneizado de VD.	83
Figura 36 - Expressão do ER- α por Western Blot em homogeneizado de VD.	84
Figura 37 - Expressão do ER- β por Western Blot em homogeneizado de VD.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação atualizada da Hipertensão Pulmonar	13
Tabela 2 - Parâmetros ecocardiográficos analisados 21 dias após administração de monocrotalina ou salina	69
Tabela 3 - Parâmetros hemodinâmicos analisados 21 dias após administração de monocrotalina ou salina em ventrículo direito de ratas	71
Tabela 4 - Avaliações morfométricas analisadas 21 dias após administração de monocrotalina ou salina em ventrículo direito de ratas	72
Tabela 5 - Avaliações bioquímicas analisadas 21 dias após administração de monocrotalina ou salina em ventrículo direito de ratas	75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR	12
1.2 MODELO DE MONOCROTALINA PARA INDUÇÃO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR	15
1.3 ESTROGÊNIO E SEUS RECEPTORES	18
1.4 ESTROGÊNIO E HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR	20
1.5 ESTROGÊNIO E REMODELAMENTO PULMONAR E CARDÍACO	21
1.6 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	24
1.7 DEFESAS ANTIOXIDANTES E ESTROGÊNIO	27
2 HIPÓTESE	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 ANIMAIS	34
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	35
4.3 OVARECTOMIA BILATERAL	35
4.4 INDUÇÃO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR	36
4.5 DETERMINAÇÃO DO CICLO ESTRAL	36
4.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	37
4.6.1 Protocolo experimental I - pulmão	37
4.6.2 Protocolo experimental II - ventrículo direito	38
4.7 AVALIAÇÃO FUNCIONAL POR ECOCARDIOGRAFIA	39
4.8 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA	40
4.9 ÍNDICES DE HIPERTROFIA CARDÍACA	41
4.10 PREPARAÇÃO DOS HOMOGENEIZADOS	41
4.11 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	42
4.12 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS	42
4.12.1 Concentração de peróxido de hidrogênio	42
4.12.2 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	43
4.12.3 Atividade da enzima catalase (CAT)	43
4.12.4 Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)	44
4.12.5 Atividade da NADPH oxidase	45
4.12.6 Atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS)	45
4.12.7 Nitritos totais	45
4.12.8 Lipoperoxidação avaliada por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	46
4.12.9 Lipoperoxidação por quimiluminescência (QL)	46
4.12.10 Técnica de oxidação de proteínas (Carbonilas)	47
4.13 HISTOLOGIA	48
4.14 EXPRESSÃO PROTEICA POR <i>WESTERN BLOT</i>	49
4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
5. RESULTADOS	51
5.1 RESULTADOS OBTIDOS NO EXPERIMENTO I REFERENTE AO PULMÃO:	51
5.1.1 Atividade da enzima NADPH oxidase	51
5.1.2 Expressão e atividade da enzima SOD-1	52
5.1.3 Atividade enzimática da NOS	54
5.1.4 Concentração de nitritos totais	55
5.1.5 Concentração do peróxido de hidrogênio	56
5.1.6 Atividade enzimática da CAT e expressão da Prx VI	57

5.1.7 Lipoperoxidação.....	59
5.1.8 Expressão das proteínas ER- α e ER- β	60
5.1.9 Dados histológicos	62
5.1.10 Expressão de proteínas envolvidas com inflamação – TLR4, MyD88 e NF κ B	64
5.2 RESULTADOS OBTIDOS NO EXPERIMENTO II REFERENTE AO VENTRÍCULO DIREITO:.....	69
5.2.1 Análises ecocardiográficas	69
5.2.2 Avaliação hemodinâmica do VD	71
5.2.3 Avaliações morfométricas.....	72
5.2.4 Determinação da oxidação de proteínas e lipoperoxidação.....	73
5.2.5 Avaliações Bioquímicas	74
5.2.6 Expressão das proteínas SOD-1, CAT, GPx-1 e eNOS	75
5.2.7 Expressão das proteínas Nrf2, HO-1, Trx-1, Prx VI e Grx-1	79
5.2.8 Expressão dos receptores ER- α e ER- β	84
6 DISCUSSÃO CONCLUSIVA	86
7 CONCLUSÕES	101
8 REFERENCIAS	102
ANEXO I	115
ANEXO II	116

1 INTRODUÇÃO

1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é definida como um grupo de doenças caracterizada por vasoconstrição, proliferação celular, fibrose e remodelamento vascular das pequenas artérias pulmonares, que leva ao aumento progressivo da resistência vascular pulmonar. A resistência pulmonar aumentada irá determinar uma sobrecarga de pressão ao ventrículo direito (VD), o qual desenvolve hipertrofia (BOGAARD et al., 2009; CHAN; LOSCALZO, 2008; YILDIZ, 2009).

Esta hipertrofia do ventrículo direito (HVD), num primeiro momento, é um mecanismo de adaptação do coração ao aumento da carga de trabalho, para manter o débito cardíaco e atenuar os aumentos do estresse de parede. No entanto, essa HVD raramente é totalmente compensatória, podendo progredir de um estado compensado para descompensado com apoptose de cardiomiócitos, fibrose intersticial, disfunção mitocondrial e comprometimento progressivo da função cardíaca, levando finalmente à insuficiência cardíaca direita (ICD) e morte (DAI et al., 2012; VONK NOORDEGRAAF; GALIÈ, 2011).

Clinicamente, a HAP é definida como pressão média na artéria pulmonar ≥ 25 mmHg em repouso, pressão de oclusão na artéria pulmonar <15 mmHg, e resistência vascular pulmonar ≥ 3 unidades Wood (MCGOON; MILLER, 2012). A HAP corresponde ao grupo 1 da classificação clínica da hipertensão pulmonar (HP), sendo que esta divisão foi baseada conforme semelhanças na patogênese, características

clínicas e opções terapêuticas (Tabela 1) (SIMONNEAU et al., 2013). É pertinente destacar que a HP continua sendo uma doença complexa, sem cura e letal.

Sua etiologia não está completamente elucidada na literatura, mas uma particularidade comum observada no desenvolvimento do remodelamento vascular, na fase inicial da doença, é um aumento significativo de estresse oxidativo e de processos inflamatórios, causando danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e morte celular (MONTANI et al., 2013). Esses eventos levam à disfunção endotelial e aumento da resposta inflamatória, que poderiam ser causas subjacentes da proliferação celular vascular e vasoconstrição aumentada, contribuindo para o remodelamento vascular pulmonar característico da HAP (VAILLANCOURT et al., 2015).

Tabela 1 - Classificação atualizada da Hipertensão Pulmonar

1. Hipertensão arterial pulmonar
1.1 HAP idiopática
1.2 HAP hereditária
1.3 Induzida por drogas e toxinas
1.4 Associada com: doença do tecido conjuntivo, por infecção por HIV, hipertensão portal, cardiopatias congênitas, esquistossomose
Doença pulmonar veno-oclusiva e /ou pulmonar hemangiomatose capilar. A HP persistente do recém-nascido (HPPRN)
2. Hipertensão pulmonar devido à doença cardíaca esquerda
3. Hipertensão pulmonar devido a doenças pulmonares e / ou hipóxia
4. Hipertensão pulmonar tromboembólica crônica
5. Hipertensão pulmonar com mecanismos multifatoriais pouco claros

Fonte: Adaptada de (Simonneau, 2013).

Dentre os principais sintomas encontrados em pacientes com HAP, a dispneia é o mais frequente. Dor no peito, tonturas e síncope podem ocorrer, principalmente durante os esforços físicos e são os principais sinais da gravidade da doença. Outros sintomas incluem palpitações, edema periférico, fadiga e fraqueza (MONTANI et al., 2013). Ressalta-se que esses sintomas estão relacionados a várias outras patologias, o que muitas vezes torna o diagnóstico tardio.

O diagnóstico da HAP necessita uma série de investigações, em que os médicos podem se basear para classificar o grupo e subgrupo da HP, bem como, o comprometimento funcional e hemodinâmico dos pacientes. Essa detecção e avaliação é feita através de vários exames, como o eletrocardiograma, a radiografia de tórax e o ecocardiograma. Estes fornecem informações referentes à HVD, dilatação arterial pulmonar e estimativa da pressão sistólica da artéria pulmonar, entre outras análises. O cateterismo cardíaco direito é solicitado para confirmar o diagnóstico (BARST et al., 2004; SIMONNEAU et al., 2009).

Em relação à epidemiologia da HAP, uma análise de dados de pacientes, envolvendo 55 centros dos Estados Unidos, a partir do registro REVEAL (Registro para avaliar o manejo da hipertensão arterial pulmonar a curto e longo prazo) entre 2006-2007, relatou que a média de idade de pacientes com HAP no momento do diagnóstico foi de 50 anos, sendo 79% do sexo feminino e com sobrevivência de 57% em 5 anos (MCGOON; MILLER, 2012), um prognóstico razoável se comparado à 1988 que era de apenas 34%. Pesquisadores da Irlanda e do Reino Unido destacam que 69,9% da incidência da HAP entre 2001-2009 foi de pacientes do sexo feminino (LING et al., 2012). No Brasil, dados de um estudo recente mostram que a média de idade foi de 46 anos, com uma razão de mulheres para cada homem de 3,3:1, sendo 28,7%

com HAP idiopática e com uma sobrevivência estimada de quase 74% em 3 anos (ALVES et al., 2015).

Mesmo com a melhora na sobrevida, ainda continua sendo uma doença com altos índices de morbidade e mortalidade. Importante destacar que vários estudos demonstram, em quase todos os subgrupos da HAP, a prevalência maior de mulheres com HAP do que homens, e os mecanismos precisos desta disparidade permanecem ainda desconhecidos (BADESCH et al., 2010; CHIN; RUBIN, 2008; LING et al., 2012).

1.2 MODELO DE MONOCROTALINA PARA INDUÇÃO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

Os modelos animais ajudam na compreensão da fisiopatologia de diversas doenças, como também servem para testar novos tratamentos. Entre os vários modelos para se estudar a HP, o da monocrotalina (MCT) é um dos mais utilizados pelos pesquisadores, sendo reprodutível e barato. Uma única dose subcutânea ou intraperitoneal de MCT induz HP, mimetizando algumas das características encontradas em humanos que estão no grupo da HAP, como vasculite mononuclear pulmonar, hipertrofia da túnica média arterial pulmonar e HVD (KAY; HARRIS; HEATH, 1967; MAARMAN et al., 2013).

A MCT é o principal alcaloide pirrolizidínico derivado da semente das planta do gênero *Crotalaria spectabilis* (Figura 1), e conhecida por induzir progressiva HAP em ratos (MATHEW et al., 1995). Plantas contendo esse alcaloide são comumente venenosas, afetando o gado, animais selvagens e seres humanos. A exposição humana acontece através de alimentos contaminados ou chás-medicinais. Estas

plantas crescem em abundância em zonas tropicais e subtropicais, invadindo plantações e pastagens, com mais de seiscentas espécies já identificadas e sendo numerosas na África, Índia, México e Brasil (CHEEKE, 1988). Quando administrado ou ingerido, esse alcaloide apresenta principalmente efeitos hepatotóxicos e pneumotóxicos, como também, cardiotoxicos, neurotóxicos e carcinogênicos (PITANGA et al., 2012).



Figura 1 - Imagem da *Crotalaria spectabilis*.

Fonte: disponível na web em: <http://www.jaxshells.org/lake1.htm>

Os alcaloides são compostos que contêm nitrogênio em um anel heterocíclico e são geralmente de caráter básico. Possuem sabor amargo, fisiologicamente e farmacologicamente ativos e agem como uma defesa química das plantas contra herbívoros (CHEEKE, 1988; PRAKASH et al., 1999). A hepatotoxicidade dos alcaloides pirrolizidínicos pode estar associada à insaturação entre os carbonos 1 e 2, e que na presença de oxidases causa a formação de pirróis, que se associam a grupos nucleofílicos de macromoléculas, como hidroxila e globulinas, assim como

purinas e pirimidinas, formando ligações irreversíveis com o DNA e ácido ribonucleico (RNA), promovendo efeitos deletérios (MATTOCKS et al., 1986).

O efeito tóxico da MCT somente é exercido quando for metabolizada pelo sistema enzimático citocromo P450 no fígado, gerando derivados pirrólicos que iniciam a lesão endotelial na vasculatura pulmonar. Dentre esses derivados, o mais importante, e sugerido como responsável pela toxicidade da MCT, é a dehidromonocrotalina. Esta acredita-se que pode afetar proteínas e DNA, e formar aductos que iniciam a toxicidade aguda ou crônica (YAO et al., 2014).

O mecanismo exato pelo qual a MCT causa HP não é claro, sugere-se que seja decorrente do dano endotelial direto ou pelo acúmulo de células inflamatórias nos pequenos vasos pulmonares (JASMIN et al., 2001; WILSON et al., 1989). As mudanças significativas na pressão da artéria pulmonar e na HVD normalmente ocorrem na terceira ou quarta semana após a exposição à MCT (LAI; OLSON; GILLESPIE, 1991).

Vários estudos experimentais, utilizando modelos clássicos de HAP (monocrotalina e hipóxia crônica), mostram que a doença é mais severa em ratos machos do que fêmeas. Os mesmos sugerem efeitos protetores do estrogênio e do sexo feminino na HAP experimental, e que talvez isso possa ser explicado pelo metabolismo da MCT no fígado ou pela complexidade do metabolismo do estrogênio e de seus receptores (KASAHARA et al., 1997; TOFOVIC; JACKSON, 2013; TOFOVIC, 2010 a; UMAR et al., 2011).

1.3 ESTROGÊNIO E SEUS RECEPTORES

Os estrogênios são hormônios esteroides com efeitos protetores sobre o sistema cardiovascular (XING et al., 2009). Estes hormônios têm ações diretas sobre as células vasculares e cardiomiócitos ou indiretas, através de efeitos sistêmicos. Podem alterar a expressão ou atividade dos canais iônicos, das proteínas contráteis e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MURPHY, 2011).

Dentre os três estrogênios naturalmente produzidos: estrona, estriol e estradiol, este último é o principal hormônio ativo e circulante. Nas mulheres, as oscilações nos níveis de estrogênio, dependendo da idade e do ciclo menstrual, podem intensificar a complexidade da sua sinalização (MARTIN; PABELICK, 2014). Estes hormônios são sintetizados a partir da clivagem da cadeia lateral do colesterol pelo complexo enzimático P450 na mitocôndria. O colesterol é convertido à pregnenolona, que pode ser convertida pela 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase em progesterona (3 β -HSD) ou a deidroepiandrosterona (DHEA) pela enzima P450c17. A DHEA pode ser ainda convertida em androstenodiona pela 3 β -HSD e, posteriormente, à testosterona pela 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase ou estrona pela aromatase. Estes hormônios podem, então, ser convertidos a estradiol (SATHISH; MARTIN; PRAKASH, 2015).

O 17 β -estradiol é produzido diretamente no ovário de mulheres em idade reprodutiva, como também periféricamente na mama, útero, cérebro, pele, adipócitos, fibroblastos cardíacos, miócitos, células endoteliais e do músculo liso vascular, sugerindo que a conversão local de estradiol pode ser importante no sistema cardiovascular (HARADA et al., 1999; PAYNE; HALES, 2013).

Embora os hormônios sexuais femininos possam modular a HAP, as alterações no metabolismo dos estrogênios e seus vários metabólitos biologicamente ativos também se encontram implicados na fisiopatologia da HAP (LAHM; TUDER; PETRACHE, 2014; MAIR et al., 2014). Os estrogênios são metabolizados por sulfatação ou glicuronidação, e seus conjugados são excretados na bile ou urina. Também podem sofrer hidroxilação e subsequente metilação, formando 2-hidroxiestrone, 4-hidroxiestrone e 16 α -hidroxiestrone (estrogênios catecol), dentre os quais os dois últimos são considerados cancerígenos. A metilação de 2 e 4-hidroxiestrone pela catecol O-metiltransferase produz metabólitos de estrogênio metoxilados. O 2-metoxiestradiol é considerado um metabólito anti-angiogênico e anti-mitogênico.

As ações específicas dos estrogênios são determinadas pela estrutura do hormônio, o tipo de receptor e suas isoformas, e o equilíbrio de co-ativadores e co-repressores que podem modular a resposta final do hormônio (GRUBER et al., 2002; GRUBER; HUBER, 2001). São transportados no plasma ligados à albumina e a globulinas, alcançam seus tecidos-alvo e desprendem-se destas proteínas, atravessando por difusão simples ou facilitada no citosol e se ligam aos seus receptores específicos (GRUBER et al., 2002).

O mecanismo de ação do estradiol ocorre através de seus receptores de estrogênio nucleares α e β (ER- α e ER- β) ou do receptor de estrogênio acoplado à proteína G de membrana (GPER). Na sinalização clássica ou genômica, dois complexos hormônio/receptor nuclear no citoplasma se dimerizam, após se translocam para o núcleo e se ligam ao elemento responsivo ao estrogênio (ERE), atuando como um fator de transcrição clássico. Esta ativação também pode ocorrer independente do estrogênio, pela fosforilação direta de ligantes não estrogênicos,

como o fator de crescimento epidérmico (AUSTIN et al., 2013). Na sinalização não clássica ou não genômica, acontece a interação do estrogênio com o GPER e a ativação direta de proteínas quinases ou outros segundos mensageiros, levando a rápidos efeitos celulares (GUPTE; POWNALL; HAMILTON, 2015). Estes efeitos também podem ocorrer através dos receptores ER- α e β localizados na membrana plasmática (ALEXAKI et al., 2006; AUSTIN et al., 2013).

As diferenças na distribuição nos tecidos, modificações pós-traducionais e isoformas destes receptores parecem modular a resposta ao estrogênio. Ambos os receptores ER- α e ER- β são abundantemente expressos no sistema cardiovascular, respiratório, nervoso e imunológico, mostrando efeitos contraditórios em diferentes tecidos, contribuindo ainda mais para a complexidade dos efeitos dos receptores de estrogênio (ERs) (AUSTIN et al., 2013; KNOWLTON; LEE, 2012; UMAR et al., 2011).

1.4 ESTROGÊNIO E HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

Os efeitos relacionados ao gênero na patogênese da HAP não estão completamente compreendidos, mas ser do sexo feminino representa um importante fator de risco para o desenvolvimento da HAP (LAHM; TUDER; PETRACHE, 2014). Embora as mulheres sejam mais atingidas com esta doença, a função do VD e sua sobrevida é melhor frente aos homens, e isto é chamado o “paradoxo do estrogênio” na HAP (AUSTIN et al., 2013; TOFOVIC, 2010 b). Reforçando o paradoxo, vários estudos com animais tem sugerido um efeito protetor em relação ao gênero feminino e um papel preventivo e terapêutico do estrogênio na HP (FARHAT et al., 1993; UMAR et al., 2011).

No estudo de Umar et al., utilizando o modelo de MCT, verificou-se que o tratamento por 10 dias com 17 β -estradiol em ratos machos, após 21 dias da administração da MCT, restaurou a estrutura e função do pulmão, bem como do coração, com uma sobrevivência de 100%. O 17 β -estradiol também foi capaz de reduzir significativamente a inflamação pulmonar, limitando a infiltração de monócitos/macrófagos e, assim, aliviando a HP (UMAR et al., 2011). O metabólito ativo do 17- β estradiol, 2-metoxiestradiol, tem propriedades antiproliferativas e, quando usado como tratamento em ratos, proporcionou uma redução na progressão da doença (TOFOVIC et al., 2010 a). Outro estudo, no entanto, observou que o aumento do metabolismo do estrogênio mediado pela enzima citocromo P450 1B1 (CYP1B1) promoveu o desenvolvimento de HAP, provavelmente através da formação do metabólito 16 α -hidroxiestrone (WHITE et al., 2012).

As contradições entre estudos experimentais da HAP comparada à doença em humanos podem ser explicadas pela complexidade do metabolismo do estrogênio e as limitações dos modelos experimentais utilizados (TOFOVIC; JACKSON, 2013).

1.5 ESTROGÊNIO E REMODELAMENTO PULMONAR E CARDÍACO

O remodelamento vascular pulmonar, característico da HAP, é demonstrado por uma proliferação excessiva de células endoteliais pulmonares, células musculares lisas e fibroblastos, resultando no espessamento das paredes arteriolares e formação de lesões plexiformes, que é a causa subjacente da resistência vascular aumentada (RABINOVITCH, 2008; TUDER et al., 2007).

Os resultados provocados pelos estrogênios na vasculatura pulmonar já estão bem documentados, como o aumento da liberação de prostaciclina e produção de óxido nítrico (NO). Através de seus receptores, este hormônio pode aumentar os níveis de RNAm da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e sua atividade, assim como, a regulação negativa da expressão de endotelina-1 (ET-1), um potente vasoconstritor (EARLEY; RESTA, 2002; GONZALES; WALKER; KANAGY, 2001)

Na HAP experimental induzida por MCT ou por exposição à hipóxia crônica, o 17 β -estradiol apresenta efeitos protetores, da mesma forma que, ratas com HAP induzida por MCT desenvolvem doença menos severa comparada com os machos (AHN et al., 2003). O pré-tratamento com 17 β -estradiol em machos atenua o desenvolvimento da doença, impedindo o remodelamento vascular pulmonar e HVD (FARHAT et al., 1993). Em ratas ovariectomizadas e com MCT foi observado edema pulmonar, o que era esperado como efeito da droga; no entanto, nos animais que receberam reposição de 17 β -estradiol, a congestão pulmonar foi revertida (SIQUEIRA et al., 2011). Contudo, o papel dos estrogênios na patogênese e progressão da HP ainda é controverso (PUGH; HEMNES, 2010).

Condições que desequilibrem o metabolismo do estrogênio como, estresse oxidativo, inflamação, drogas e hipóxia, podem gerar efeitos adversos no remodelamento vascular pulmonar e na progressão da doença (TOFOVIC, 2010 b). Aumento da produção de EROs provoca diminuição da biodisponibilidade do NO, que está relacionado ao dano vascular, favorecendo a formação de peroxinitrito (IRANI, 2000; MENDELSON; KARAS, 1999). Uma molécula geradora de EROs, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, também está implicada no desenvolvimento da HP, com um papel importante na regulação da hipertrofia e remodelamento da artéria pulmonar (RAJKUMAR et al., 2010).

A inflamação também está implicada na fisiopatologia de várias categorias da HAP, uma vez que os mediadores inflamatórios causam vasoconstrição e contribuem para o remodelamento vascular, sugerindo que alterações no metabolismo do estrogênio podem aumentar o ambiente pró-inflamatório e agravar a progressão da doença (HASSOUN et al., 2009; TOFOVIC, 2010 b).

Em relação ao remodelamento cardíaco, os efeitos patológicos no VD, como hipertrofia e dilatação, em decorrência da disfunção pulmonar caracterizam o quadro chamado de *Cor pulmonale*. Esta doença afeta em torno de 20% dos casos de pacientes com insuficiência cardíaca (IC). Frequentemente a HAP é o elo entre as mudanças funcionais e estruturais do VD e a patologia do pulmão (CHAOUAT; NAEIJE; WEITZENBLUM, 2008).

Vários estudos demonstram que o estrogênio pode atenuar ou inibir o remodelamento cardíaco (HOMMA et al., 2006; PATTEN et al., 2008; VAN EICKELS et al., 2001). Foi demonstrado que o ER- β pode mediar os efeitos cardioprotetores do estrogênio frente à sobrecarga de pressão (FLIEGNER et al., 2010). Kararigas e colaboradores (2011) observaram uma redução da expressão de genes relacionados com fosforilação oxidativa e a atividade da citocromo P450, em resposta à sobrecarga de pressão, em camundongos com ovários e ER- β intactos. A citocromo P450 gera EROs como um produto do metabolismo de xenobióticos e, possivelmente, de outras vias. Além disso, postula-se que a redução das EROs pode também contribuir para evitar um aumento da resposta inflamatória associada com o desenvolvimento da hipertrofia (GONZALEZ, 2005; KARARIGAS et al., 2011).

A terapia com estrogênio, em modelo experimental de insuficiência cardíaca direita, tem mostrado uma reversão do remodelamento ventricular direito induzido pela

HP, associado com disfunção do VD (LAHM et al., 2012; NADADUR et al., 2012). Um estudo utilizando genisteína, um fitoestrogênio derivado da soja, melhorou a fração de ejeção, hipertrofia e dilatação do VD, bem como parâmetros pulmonares. O pré-tratamento com a genisteína foi capaz de atenuar a HP, e este resultado parece ser mediado via ER- β (MATORI et al., 2012). A relação entre gênero e hipertrofia do VD é complexa e parece depender do modelo experimental, etiologia da hipertrofia, idade e o estágio da descompensação. Está se tornando cada vez mais evidente que o estrogênio tem efeitos diretos no miocárdio independente da ação do hormônio na vasculatura (SKAVDAHL et al., 2005; VAN EICKELS et al., 2001).

Conhecida a importância prognóstica da disfunção do VD na HAP, os mecanismos celulares e moleculares subjacentes a essa disfunção precisam ser investigados, visto que podem ser potencialmente reversíveis (GOMEZ-ARROYO et al., 2013).

Os mecanismos moleculares de transição da hipertrofia compensada para a hipertrofia descompensada no VD não estão bem definidos, mas sugere-se que modificações neuro-humorais, ativação do sistema imune, estresse oxidativo e estresse nitrosativo, entre outros, modifiquem o remodelamento cardíaco e o desenvolvimento da ICD na HAP (BOGAARD et al., 2009).

1.6 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

As EROs e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são duas classes de moléculas quimicamente reativas, que incluem espécies chamadas radicais livres, tais como o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxil ($\cdot OH$), e não-radicais como

o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (NICKENIG, 2002; TABIMA; FRIZZELL; GLADWIN, 2012).

Os mecanismos químicos implícitos à formação dos radicais livres e sua toxicidade foram propostos em 1894 pelo químico Henry JH Fenton, que mostrou que a formação do $\cdot OH$, a partir do H_2O_2 , é catalisada por íons ferro e chamada de “reação de Fenton” (KOPPENOL, 1993). Posteriormente, em 1934, os químicos Joseph Weiss e Fritz Haber, descobriram que o $O_2^{\cdot -}$ pode se combinar com H_2O_2 e, formar $\cdot OH$, a chamada “reação de Haber-Weiss” (KEHRER, 2000). Esta reação mostra que um radical livre pode dar origem a um outro radical secundário.

Somente mais tarde, observaram que não apenas estes são agentes oxidantes potentes mas também moléculas não-radicais, como o H_2O_2 ou o ácido hipocloroso ($HOCl$), participam das reações dos radicais livres (HALLIWELL, 1989). Justamente para incorporar tanto radicais livres como espécies não-radicalares, foi introduzido o termo geral "espécies reativas de oxigênio". Além disso, demonstrou-se que o radical óxido nítrico ($NO\cdot$) pode interagir com as EROs, e formar as ERNs, como o $ONOO^-$. Uma produção excessiva destas espécies é capaz de induzir danos a lipídios, proteínas e DNA, originando o que é chamado de “estresse oxidativo” (SIES, 1997).

O conceito de estresse oxidativo é frequentemente usado em várias situações bioquímicas, fisiológicas e patofisiológicas, que descrevem o resultado de um aumento na produção e / ou uma diminuição na eliminação das EROs. Desta forma, o estresse oxidativo é um desequilíbrio entre os oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes. O organismo deve manter o equilíbrio entre a produção dos oxidantes e a atividade do sistema de defesa antioxidante, na tentativa de manter a homeostase

redox (GRUBER; SCHAFFER; HALLIWELL, 2008). Outro conceito aborda a possibilidade de que as alterações/desordens na função e homeostasia dos sistemas tióis sejam a característica principal do estresse oxidativo, levando a alterações na sinalização intracelular (JONES, 2008).

As EROs são produzidas como intermediárias das reações de oxidação-redução, isto é, são produtos do metabolismo celular normal. Participam nas vias de sinalização intracelular, regulação de transcrição e outros eventos celulares implicados na manutenção da homeostase redox.

Vários compartimentos e complexos enzimáticos dentro da célula podem gerar EROs, mas a grande maioria destas espécies (cerca de 90%) é produzida na mitocôndria. Os sistemas enzimáticos são também importantes fontes geradoras de EROs na parede vascular, o que inclui a NADPH oxidase, xantina oxidase, enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e a eNOS desacoplada (Figura 2) (LUSHCHAK; EARLEY; RESTA, 2014; MONTEZANO; TOUYZ, 2012).

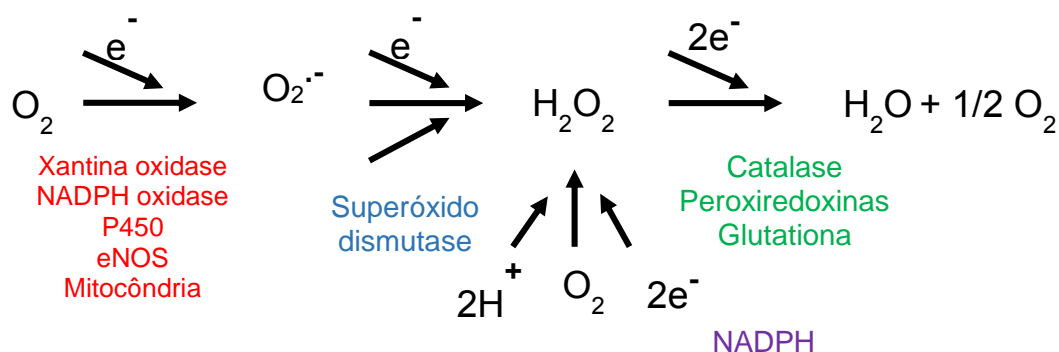


Figura 2 - Redução do oxigênio molecular à água

Fonte: Adaptada de (CRAIGE; KANT; KEANEY, 2015)

Destas, as NADPH oxidases são de importância principal para a geração de EROs. Diversas isoformas desta enzima, como a Nox4, produzem $O_2^{\cdot-}$ na parede vascular, nas células do músculo liso e endoteliais, bem como na adventícia (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). A xantina oxidase catalisa a hidroxilação de hipoxantina para produzir xantina e ácido úrico. Níveis aumentados de ácido úrico podem ser um indicador da regulação para cima da atividade da xantina oxidase, um importante sistema de geração de radicais de oxigênio na fisiologia humana (ROCHETTE et al., 2013).

A atividade enzimática da óxido nítrico sintase (NOS), enzima que sintetiza NO a partir de L-arginina, é rigorosamente controlada e dependente da disponibilidade do substrato e de cofatores, assim como, da velocidade de transferência de elétrons. Estes fatores também estão envolvidos em outras vias metabólicas importantes na célula, ligando assim a atividade da NOS com outras vias metabólicas (THOMAS et al., 2008).

O aumento dos marcadores de estresse oxidativo são encontrados em muitos pacientes e em vários modelos experimentais de HAP, fundamentando a percepção de que as EROs e ERNs desempenham um papel significativo no desenvolvimento e progressão da HP.

1.7 DEFESAS ANTIOXIDANTES E ESTROGÊNIO

Um dos mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo induzido pelos radicais livres compreende as defesas antioxidantes. Segundo Halliwell e Gutteridge

(1999), um antioxidante é "qualquer substância que retarda, impede ou elimina o dano oxidativo em uma molécula alvo". Isto é, são substâncias com função de reduzir o estresse oxidativo, mutações de DNA, assim como outros parâmetros de dano celular (PISOSCHI; POP, 2015).

Os antioxidantes são moléculas que podem doar elétrons e ou átomos de hidrogênio a oxidantes, e assim, cessar as reações em cadeia, assegurando a homeostase redox celular. As defesas antioxidantes podem ser enzimáticas, que incluem, entre outras, a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT), ou não-enzimáticas representados pela glutatona reduzida (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), carotenoides, flavonoides, dentre outros antioxidantes. Em condições normais, existe um equilíbrio entre as atividades e os níveis intracelulares destes antioxidantes, e esta proporcionalidade é essencial para a saúde e sobrevivência do organismo (VALKO et al., 2007; WANG; CHUN; SONG, 2013)

A dismutação do $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 é catalizada pela enzima SOD, que existe em diferentes compartimentos celulares e com várias isoformas, como a SOD 1 (CuZnSOD) encontrada no citoplasma, espaços entre as membranas mitocondriais, núcleo e lisossomas. A CAT, normalmente localizada nos peroxissomas, catalisa a conversão do H_2O_2 à água e oxigênio. Além disso, esta enzima trabalha com altas taxas de substrato. O H_2O_2 também pode ser convertido em O_2 por meio da reação de conversão de glutatona reduzida (GSH) à glutatona oxidada (GSSG), catalisada pela glutatona peroxidase (GPx).

O sistema tioredoxina (tioredoxina (Trx) e tioredoxina redutase) em colaboração com o sistema da GSH, desempenha um papel importante na redução

de proteínas contendo tióis oxidados. Da mesma forma, o sistema da glutarredoxina (Grx) e peroxiredoxinas (Prx) (FARACI; DIDION, 2004; VALKO et al., 2006); além disso, a Trx é importante para manter a Prx no seu estado reduzido. A Prx exerce sua principal função reduzindo o H₂O₂ à água, funcionando com pequenas variações da concentração deste peróxido. Também tem um papel importante sobre a inibição da oxidação de proteínas envolvidas na remodelamento cardíaco patológico e apoptose (BURGOYNE et al., 2013).

Nesse contexto dos antioxidantes, o estrogênio possui efeito de "varredor" de radicais livres, que pode ser através do aumento da biodisponibilidade do NO e da modulação da atividade da NADPH (WAGNER; SCHROETER; HECKER, 2001; WASSMANN et al., 2001). Além disso, pode regular a expressão do fator nuclear 2 derivado de eritróide (Nrf2), que atua na transcrição de muitas enzimas antioxidantes como heme oxigenase 1 (HO-1), SOD, Prx e Trx (MASSAFRA et al., 2000; RUIZ-LARREA et al., 1997).

A enzima HO-1 desempenha um papel importante na metabolização do grupo heme à biliverdina, ferro e monóxido de carbono. A biliverdina pode ser reduzida à bilirrubina, um antioxidante, e diminuir a formação do [•]OH (GOZZELINO; JENEY; SOARES, 2010). Outro fator de transcrição redox-sensível, que pode modular a transcrição de genes envolvidos com o estado oxidativo celular de morte e sobrevivência, é o fator nuclear kappa B (NFkB). As EROs podem ativá-lo ou inibi-lo, dependendo do nível de EROs e tipos de estímulos e células (PANTANO et al., 2006).

No sistema cardiovascular, os efeitos antioxidantes dos estrogênios são exercidos na atenuação da inflamação, indução do relaxamento vascular e ativação da via de sobrevivência fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/proteína quinase B (Akt)

(MURPHY, 2011). Níveis baixos de EROs atuam como mensageiros intracelulares, enquanto níveis elevados contribuem para a doença cardiovascular (ROCHETTE et al., 2013). Alterações mediadas pelos estrogênios na produção destas espécies, portanto, poderiam ser responsáveis por algumas das diferenças entre gêneros e a função cardiovascular.

2 HIPÓTESE

A monocrotalina, por induzir estresse oxidativo, promove aumento da resistência vascular pulmonar, determinando uma elevação da pós-carga imposta ao ventrículo direito, o qual sofre um remodelamento. Os hormônios ovarianos podem estimular as defesas antioxidantes, reduzindo o estresse oxidativo e, desta forma, atenuar o desenvolvimento da HAP. Portanto, a retirada dos hormônios ovarianos determinaria um aumento do estresse oxidativo tanto no pulmão quanto no ventrículo direito das ratas com HAP induzida por MCT.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do estresse oxidativo, no pulmão e no ventrículo direito, em ratas com HAP induzida por MCT submetidas ou não à ovariectomia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Experimento I - Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo e inflamação no pulmão de fêmeas *Wistar* com HAP, ovariectomizadas ou não, através das seguintes análises:

- parâmetros relativos à produção de NO, radical superóxido e peróxido de hidrogênio;
- dano oxidativo a lipídios;
- atividade e expressão de enzimas antioxidantes;
- expressão dos receptores nucleares de estrogênio;
- histologia do parênquima pulmonar;
- expressão de proteínas relacionadas à inflamação.

Experimento II – Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo e função do ventrículo direito de fêmeas *Wistar* com HAP, ovariectomizadas ou não, através das seguintes análises:

- avaliação ecocardiográfica e cateterismo do ventrículo direito;
- parâmetros morfométricos relativos ao ventrículo direito e útero;
- parâmetros relativos à produção de NO e peróxido de hidrogênio;
- dano oxidativo a lipídios;
- atividade e expressão de enzimas antioxidantes;
- expressão de fator de transcrição e antioxidantes por ele regulados;
- expressão dos receptores nucleares de estrogênio.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para este estudo, foram utilizadas ratas *Wistar* com dois meses de idade, pesando entre 180 ± 50 g, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), órgão auxiliar do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram agrupados em caixas plásticas com medidas de 270 x 260 x 310 mm, com o assoalho recoberto por serragem, sendo 4 animais por caixa, com acesso à água e alimentação à vontade. A temperatura ambiente ficou em torno de 22°C, houve um controle cíclico de 12 horas claro/escuro e umidade relativa do ar de 70%.

Todos os procedimentos com os animais foram de acordo com a Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA 2013 e conforme a Lei Nº. 11.794, de 08 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal do Brasil, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Projeto nº 21372).

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram estabelecidos quatro grupos experimentais, dois grupos controle: sham e ovariectomia; e dois grupos MCT: sham e ovariectomia.

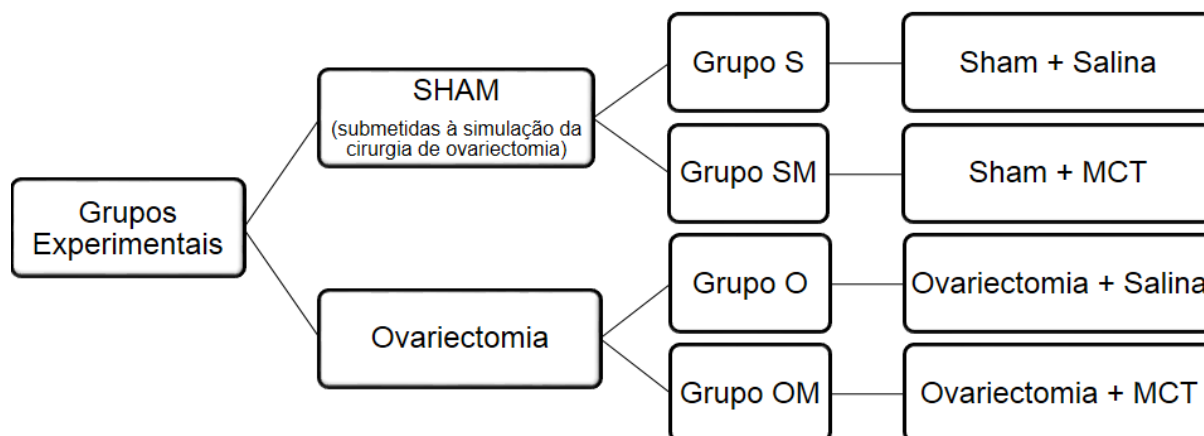


Figura 3 – Grupos experimentais

4.3 OVARIECTOMIA BILATERAL

A ovariectomia é um procedimento cirúrgico que consiste na retirada dos ovários com o objetivo de ocasionar uma redução significativa dos níveis de estrogênio circulantes. As ratas foram anestesiadas com quetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/Kg), por via intraperitoneal, e colocadas em uma mesa cirúrgica própria para animais de pequeno porte. Uma incisão foi realizada na pele e no tecido subcutâneo entre a crista ilíaca e as costelas: uma segunda incisão atingiu a camada muscular, até a visualização dos ovários. Depois de identificado, o ovário foi exposto e ligado abaixo da tuba uterina, retirando-o. Após a cirurgia, a sutura da incisão foi realizada em planos separados, com linha de nylon, primeiro a camada muscular e

depois a cutânea (CAMPBELL; FEBBRAIO, 2002). O procedimento foi realizado bilateralmente. Nos grupos S e SM foi realizado o mesmo procedimento; no entanto, não houve ligadura nem a retirada dos ovários.

4.4 INDUÇÃO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

A indução da hipertensão arterial pulmonar foi realizada 7 dias após a cirurgia de ovariectomia ou simulação da mesma, para cada animal, através de uma única injeção intraperitoneal da droga MCT (60 mg/kg) (WERCHAN et al., 1989). A diluição da MCT foi realizada em HCl 0,1 N. Após a diluição, o pH foi ajustado até que atingisse o valor de 7,4 com adição de NaOH 1N (SINGAL et al., 2000). Após a neutralização, adiciona-se o volume de solução fisiológica (NaCl 0,9%) necessário para completar 1 mL. Assim, será injetado em microlitros (μL) exatamente a mesma massa do animal em gramas (Ex: animal com 100 gramas receberá 100 μL). Os animais dos grupos S e O receberam uma única injeção com mesmo volume e via de administração de solução salina, nas mesmas condições experimentais. Após a indução da HAP, os animais foram pesados e acompanhados semanalmente para identificarmos os sintomas característicos da insuficiência cardíaca direita (cianose, letargia, redução no ganho de massa corporal) (PICHARDO et al., 1999).

4.5 DETERMINAÇÃO DO CICLO ESTRAL

Nos animais que não foram submetidos à cirurgia de ovariectomia (grupos S e SM), a determinação do ciclo estral foi iniciada a partir do 28º dia após o

procedimento cirúrgico de simulação da ovariectomia bilateral. O ciclo estral em cada fêmea foi determinado por observação do esfregaço vaginal. A secreção vaginal foi coletada com pipeta de plástico. Solução salina foi colocada na abertura vaginal através da pipeta, aspirada e, colocada em lâminas para serem observadas a fresco no microscópio óptico. As lâminas foram comparadas com os achados de Freeman (FREEMAN, 2006). Todos os animais não ovariectomizados foram mortos na fase do diestro, por ser esta fase a de menor concentração sérica de estrogênio, reduzindo a influência hormonal nos parâmetros analisados.

4.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

O estudo foi dividido em 2 experimentos distintos, sendo o primeiro focado para a análise pulmonar e o segundo para a análise cardíaca, com os seguintes protocolos experimentais:

4.6.1 Protocolo experimental I - pulmão

Para este experimento foram utilizados 2 grupos de animais: N= 28 animais para as análises bioquímicas e moleculares, com n= 7 animais por grupo e um N= 24 animais para as análises histológicas, com n= 6 animais por grupo. Os animais foram recebidos do CREAL e ambientados no biotério por 5 dias; após este período, os mesmos foram submetidos à cirurgia de ovariectomia ou simulação da mesma, conforme protocolo representado na Figura 3. Uma semana depois (7 dias), em que os níveis hormonais de estrogênio encontram-se reduzidos, foi administrada dose

única intraperitoneal de MCT (SM e OM) ou salina (S e O) para a indução da hipertensão arterial pulmonar. Passadas três semanas (21 dias), os animais foram anestesiados com uma sobredosagem anestésica com quetamina (180 mg/kg i.p.) e xilazina (20 mg/Kg i.p.) em conjunto com heparina sódica (50 U por animal). A lavagem do sistema vascular foi feita com solução de NaCl a 0,9%, a uma pressão constante (80-90 mmHg) através do ventrículo esquerdo, seguido por solução tamponada de formalina a 4%, a fim de fixar o tecido pulmonar para as análises histológicas. Nos animais dos grupos S e SM (que não sofreram a ovariectomia), a perfusão dos tecidos foi realizada após a detecção do ciclo estral na fase do diestro. Durante o período experimental, os animais foram pesados semanalmente com a finalidade de acompanhamento da evolução do peso corporal.

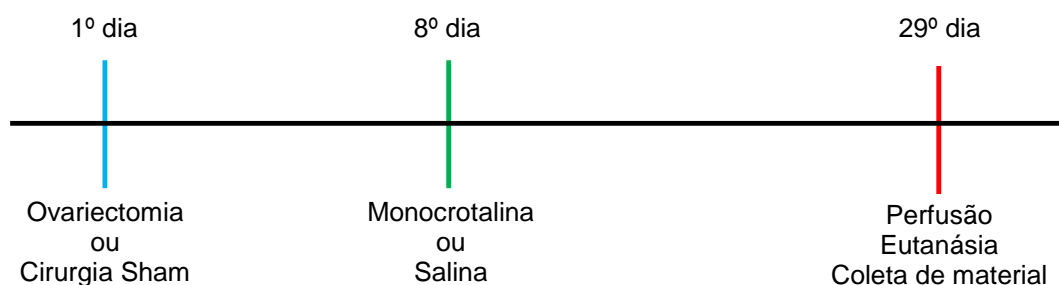


Figura 4 - Desenho experimental do experimento I

4.6.2 Protocolo experimental II - ventrículo direito

Para este experimento foram utilizados um N= 28 animais para as análises hemodinâmicas, bioquímicas e moleculares, com n= 7 animais por grupo. Os animais foram recebidos do CREAL e ambientados no biotério por 5 dias; após este período, os mesmos foram submetidos à cirurgia de ovariectomia ou simulação da mesma

conforme protocolo representado na Figura 4. Uma semana depois (7 dias), em que os níveis hormonais de estrogênio encontram-se reduzidos, foi administrada dose única intraperitoneal de MCT (SM e OM) ou salina (S e O) para a indução da hipertensão arterial pulmonar. Passadas três semanas (21 dias), os animais foram anestesiados com quetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/Kg) para realizar análise ecocardiográfica e, após, a avaliação hemodinâmica. Depois dos registros hemodinâmicos, foi aplicada uma sobredosagem anestésica com quetamina (180 mg/kg i.p.) e xilazina (20 mg/Kg i.p.), seguido por deslocamento cervical. Os animais dos grupos S e SM, que não realizaram a ovariectomia, somente foram mortos após a detecção do ciclo estral na fase do diestro. Durante o período experimental, os animais foram pesados semanalmente com a finalidade de acompanhamento da evolução do peso corporal.

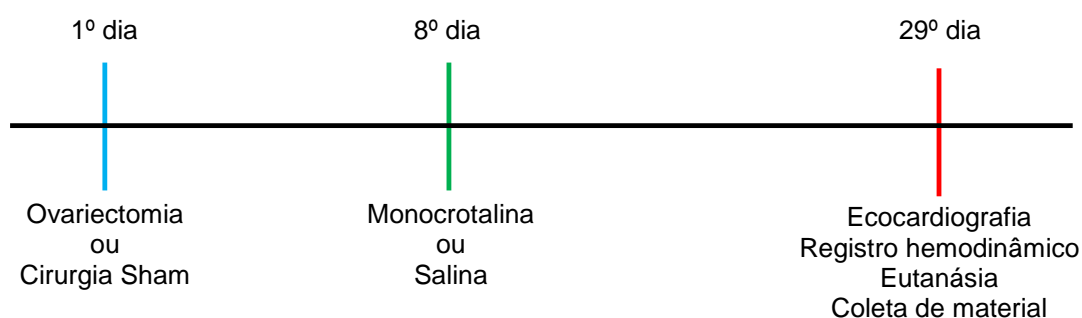


Figura 5 - Desenho experimental do experimento II

4.7 AVALIAÇÃO FUNCIONAL POR ECOCARDIOGRAFIA

A análise ecocardiográfica foi realizada sob anestesia com quetamina (90 mg/kg i.p.) e xilazina (10 mg/kg i.p.). As imagens foram obtidas através do modo bidimensional e do Doppler pulsado (Philips HD7 Ultrasound System, Andover, MA,

USA), com uma sonda linear L12-3 (Philips, Andover, MA, USA). Foram avaliados: a relação entre o tempo de aceleração (TAC) do fluxo pela artéria pulmonar pelo tempo de ejeção (TEJ) do fluxo pela artéria pulmonar, o volume sistólico (VS) e o débito cardíaco (DC) do ventrículo direito.

Para o cálculo do volume sistólico foi usada a seguinte fórmula: $VS = \text{área de secção transversal da artéria pulmonar (AST)} \times \text{integral tempo-velocidade do fluxo pela artéria pulmonar (VTI)}$; onde: $AST = (\text{diâmetro sistólico da artéria pulmonar}/2)^2 \times 3,14$. Para o cálculo do débito cardíaco, foi usada a seguinte fórmula: $DC = VS \times \text{frequência cardíaca (FC)}$, onde: $FC = 60/\text{intervalo RR medido durante o fluxo pela artéria pulmonar}$ (RUDSKI et al., 2010; URBONIENE et al., 2010).

4.8 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA

A avaliação hemodinâmica foi realizada após 28 dias do início do protocolo. Os animais foram novamente pesados (peso corporal final) e anestesiados com quetamina (90 mg/kg i.p.) e xilazina (10 mg/Kg i.p.). A veia jugular direita foi exposta e um cateter de polietileno (PE-50) foi implantado e introduzido até o átrio e ventrículo direito. O cateter foi conectado a um transdutor de pressão (Strain-Gauge-Narco Biosystem Transducer RP-155, Houston, Texas, USA) e acoplado a um amplificador de sinais (Pressure Amplifier HP 8850C), para monitoração da pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD) e pressão diastólica final do ventrículo direito (PDFVD). Os sinais analógicos da pressão foram digitalizados (Windaq – Data Acquisition System, PC 486) com taxa de amostragem de 1000 Hz (LUDKE et al., 2010). Com base nestes

resultados, foi calculada a pressão média da artéria pulmonar ($PmAP= 0,61*PSVD+2$) segundo

Após obtenção destes dados, foi administrada uma sobredosagem anestésica, como explicado acima, e os animais foram mortos através de deslocamento cervical. O coração foi rapidamente retirado da cavidade torácica, lavado 3 vezes em solução de KCl 1,15%, separado o ventrículo direito do ventrículo esquerdo+septo, e pesado em uma balança digital para realizar o cálculo do índice de hipertrofia cardíaca. Após a pesagem, o ventrículo direito foi seccionado e guardado em freezer -80°C para posteriores análises. Também foi retirada a tíbia, que foi medida com um paquímetro, para completar a análise de hipertrofia cardíaca.

4.9 ÍNDICES DE HIPERTROFIA CARDÍACA

A hipertrofia cardíaca é uma característica importante do remodelamento ventricular na HAP. Esta foi calculada pelas relações: massa ventricular direita/massa corporal (mg/g) e massa ventricular direita/ comprimento da tíbia (mg/mm) (HU et al., 2003).

4.10 PREPARAÇÃO DOS HOMOGENEIZADOS

O VD e o pulmão foram homogeneizados por 40 segundos em Ultra-Turax, na presença de cloreto de potássio (KCl) 1,15% (5 mL/g de tecido) e de fluoreto de fenil metil sulfonil (PMSF), na concentração de 100 mmol/L em isopropanol (10 µL/mL de KCl adicionado). O PMSF é um inibidor de proteases e é utilizado para que não ocorra

a degradação das enzimas, as quais foram medidas. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 20 minutos a 3000xg em uma centrífuga refrigerada (Sorvall RC5B – Rotor SM 24) e o sobrenadante foi aliquoteado e armazenado em freezer a -80°C, para realização das medidas determinadas (LLESUY et al., 1985).

4.11 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas do tecido cardíaco e pulmonar foram quantificadas pelo método descrito por (LOWRY et al., 1951), que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL em água destilada. As medidas foram efetuadas em um espectrofotômetro a 625nm e os resultados expressos em mg/mL.

4.12 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

4.12.1 Concentração de peróxido de hidrogênio

O ensaio foi baseado na oxidação do vermelho de fenol pelo H₂O₂, reação mediada pela peroxidase de rabanete. As amostras de ventrículo direito e de pulmão foram homogeneizadas em cloreto de potássio (1,15% w/v) e PMSF (20 mmol/L), e centrifugadas (1000 x g por 20 minutos, a 0°C). O sobrenadante foi utilizado para a análise posterior. Foi realizada uma curva padrão de H₂O₂ com diferentes concentrações (10,20 e 30 micromol/L). Após a adição do peróxido e do sobrenadante à microplaca, dá-se continuidade ao experimento com a adição do tampão dextrose (NaCl 140 mM/L, PO₄K₃ 10 mM/L, Dextrose 5,5 mM/L, pH 7,0), vermelho de fenol e

peroxidase de rabanete (PRS buffer). Após a adição do tampão PRS, a microplaca foi agitada à temperatura ambiente, por 25 min. Foi adicionado 1 mol/L de NaOH a cada uma das amostras. Após a adição de NaOH realizou-se a leitura a 610 nm. A concentração de H₂O₂ foi expressa em nmol/mg de tecido (PICK; KEISARI, 1980).

4.12.2 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A enzima SOD catalisa a reação de dois ânions superóxido, com a consequente formação de peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a CAT e a GPx. A técnica para determinação da SOD foi baseada na inibição da reação do O₂^{•-} com o pirogalol. O superóxido é gerado pela auto oxidação do pirogalol em meio básico. A SOD presente na amostra compete pelo O₂^{•-} com o sistema de detecção. Foi utilizada uma solução tampão (Tris-base 50 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 8,2), pirogalol 24 mmol/L (em ácido clorídrico a 10 mmol/L) e catalase 30 µmol/L. Para ter o resultado em unidades de SOD, necessita-se de um fator de calibração. Portanto, foi necessária a construção de uma curva padrão com concentrações conhecidas de SOD, disponível comercialmente (Sigma Chemical Co., St Louis, MO).

A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD foi determinada medindo a velocidade de formação do pirogalol oxidado. Os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína (MARKLUND, 1985).

4.12.3 Atividade da enzima catalase (CAT)

A enzima CAT possui atividade apenas para peróxido de hidrogênio, hidroperóxido de metila e etila. É uma hemoproteína que catalisa a decomposição do H_2O_2 à água e oxigênio. A atividade da CAT é diretamente proporcional à taxa de decomposição do H_2O_2 e obedece a uma cinética de pseudo-primeira ordem. Sendo assim, sua atividade pode ser medida através da avaliação do consumo do H_2O_2 . Este teste consiste em avaliar a diminuição da absorvância no comprimento de onda de 240 nm, utilizando-se cubetas de quartzo. Foi utilizada uma solução tampão de fosfato de sódio 50 mmol/L (pH 7,4) e peróxido de hidrogênio 0,3 mol/L e, monitorada a diminuição da absorvância do H_2O_2 no comprimento de onda selecionado. A concentração da CAT foi expressa em pmoles/mg de proteína (AEBI, 1984).

4.12.4 Atividade da enzima glutaciona peroxidase (GPx)

A enzima GPx catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutaciona reduzida (GSH), formando glutaciona oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido. A GPx atua acoplada à glutaciona redutase (GR), a qual catalisa a redução da GSSG à GSH, utilizando NADPH. Desta forma a atividade da GPx é determinada medindo o consumo de NADPH na presença de GSH e GR. Assim, a atividade da GPx foi medida em espectrofotômetro, observando a diminuição de absorvância do NADPH a 340 nm. Foi também adicionada azida sódica para inibir a atividade da catalase. A amostra foi previamente preparada adicionando uma mistura de cianetos para inibir a atividade pseudo-peroxidativa da hemoglobina. Os resultados foram expressos em nmoles por minuto/mg de proteína (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984).

4.12.5 Atividade da NADPH oxidase

A NADPH oxidase é uma enzima que se ativa em processos inflamatórios. Sua atividade constitui uma das fontes endógenas mais importantes das espécies reativas de oxigênio no organismo, que catalisa a transferência de um elétron do NADPH para o O_2 , formando o $O_2^{\cdot-}$. A atividade da enzima foi determinada em homogeneizado de pulmão mediante a técnica espectrofotométrica, seguindo o consumo de NADPH a 340nm. No homogeneizado foi adicionado tampão fosfato 100mM pH 7,4 e NADPH 1mg/mL. Os resultados foram expressos em nmol NADPH/min.mg proteína (WEI et al., 2006).

4.12.6 Atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS)

A atividade da NOS em homogeneizado de VD e pulmão foi avaliada pela medida da conversão da oxi-hemoglobina (HbO_2) em met-hemoglobina induzida por NO, como descrito por Valdez e colaboradores (2005). O meio de reação foi composto por (unidades em mmol/L): $CaCl_2$ 1,8; KCl 2,7; $MgCl_2$ 0,23; NaCl 137; NaH_2PO_4 3,6; glicose 5,0; HEPES 10; pH 7,4, contendo 2 mol/L HbO_2 e 1 mmol/L de L-arginina. A atividade da NOS foi expressa em nmolesNO/min/mg de proteína.

4.12.7 Nitritos totais

A quantidade total de nitritos foi determinada no homogeneizado de pulmão, de acordo com a técnica descrita por Granger e colaboradores. A reação foi iniciada pela adição do reagente de Griess. A coloração final foi detectada espectrofotometricamente a 550 nm e os resultados expressos em mmol/L (GRANGER et al., 1999).

4.12.8 Lipoperoxidação avaliada por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Radicais livres reagem com lipídios de membrana causando lipoperoxidação, com consequente formação de malondialdeído (MDA). Esta substância aquecida, em presença de ácido tiobarbitúrico, forma um composto corado que foi medido espectrofotometricamente em 532 nm. No homogeneizado de pulmão foi adicionado SDS 8,1%, ácido acético 20% pH3,5, TBA 0,8%, incubado por 1 hora a 90°C, centrifugado a 3500 RPM por 10 minutos. Após foi realizada a leitura e os resultados foram expressos em nmol TBARS/mg de proteína (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

4.12.9 Lipoperoxidação por quimiluminescência (QL)

A avaliação da lipoperoxidação foi baseada no método que consiste na adição de um hidroperóxido orgânico de origem sintética (hidroperóxido de tert-butil) ao homogeneizado de tecido, para avaliação da capacidade de resposta produzida pela amostra. No homogeneizado de VD foi adicionado tampão fosfato 20 mmol/L, 140 mmol/L KCl, pH 7,4 e hidroperóxido de tert-butil 400 mmol/L. 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 que 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, Bromma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. As determinações foram realizadas em sala escura, com frascos de vidro mantidos na penumbra, a fim de evitar a ativação da fosforescência pela luz fluorescente. Foi medida a emissão de luz e, desta, foi descontada a emissão basal (emissão de luz do tampão mais a amostra) para fins de cálculos. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps) por mg de proteína (GONZALEZ FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991).

4.12.10 Técnica de oxidação de proteínas (Carbonilas)

A avaliação da oxidação de proteínas consiste na reação da dinitrofenilhidrazina (DNPH) com as carbonilas das proteínas, formando hidrazonas que podem ser medidas espectrofotometricamente. Foi colocado 0,8 mL de DNPH (10 mmol/L) com 0,2 mL de homogeneizado em um tubo para que ocorresse reação do DNPH com as carbonilas da amostra. Os tubos foram incubados por uma hora no escuro e agitados a cada quinze minutos. Após, foi adicionado 1 mL de solução de TCA 20% (P/V) nos tubos, que foram colocados no gelo por dez minutos e centrifugados por cinco minutos em centrifuga refrigerada a 3000 rpm. Em seguida, adicionou-se ao precipitado 0,8 mL de TCA 10% (P/V) e se agitou mecanicamente

com bastão de vidro. O material foi precipitado por três vezes com 0,8 mL de etanol-acetato de etila (proporção 1:1) para remover o DNPH livre e lipídios contaminantes. O precipitado final foi dissolvido em 0,4 mL de guanidina 6 mol/L e agitado por dez minutos à 37°C. Removeu-se o material insolúvel por centrifugação adicional. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro a 360nm e o resultado expresso em nmol/mg de proteína (REZNICK; PACKER, 1994).

4.13 HISTOLOGIA

Os pulmões foram mantidos em formalina a 4% tamponada para completar o processo de fixação. Após, foram processados e foram incorporados em paraplast (Marca Fisher) para avaliação histológica. Fatias dos pulmões com 5 µm de espessura foram obtidas utilizando um micrótomo (*Microm HM200 ERGOSTAR*). Três a cinco fatias de cada animal foram colocadas em cada lâmina.

A análise morfométrica (espessura da parede alveolar e espessura da parede arteriolar) e infiltrado inflamatório foram avaliados em tecido pulmonar corado com hematoxilina-eosina. A análise de fibras de colágeno foi realizada em tecidos corados com picrossírius. As análises foram visualizadas em microscópio (Zeiss Axioscope II), acoplado à câmera fotográfica (AxioCan MR3) para captura de imagens e as imagens foram digitalizadas pelo sistema de análise de imagem por computador (versão 4.8.2 AxioVision SP2) (SANTANA et al., 2014).

4.14 EXPRESSÃO PROTEICA POR *WESTERN BLOT*

O sobrenadante da homogeneização do VD e do pulmão foi utilizado para a análise de *Western Blot*. Quarenta e oito microgramas de proteínas foram submetidas à eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio- (SDS-PAGE), em um sistema descontínuo, utilizando diferentes concentrações de gel de separação (ARAUJO et al., 2006; LAEMMLI, 1970). As proteínas separadas foram transferidas eletroforeticamente para membranas de PVDF utilizando um tampão de transferência (pH 8,2, Tris 25 mmol/L, glicina 192 mmol/L e SDS a 0,1%) em um sistema arrefecido Bio-Rad transblot (Bio-Rad, SP, SP, Brasil). Os sítios inespecíficos de ligação foram bloqueados com 1h de incubação com leite em pó desnatado, em tampão Tris. As membranas foram processadas por imunodeteção, utilizando os seguintes anticorpos primários: anti-CAT (64 kDa), anti-SOD-1 (23 kDa), anti-GPx (22 kDa), anti-HO-1 (32 kDa), anti-Prx VI (25 kDa), anti-Trx-1 (12 kDa), anti-Grx 1 (12 kDa), anti-Nrf2 (57 kDa), anti-ER- β (56 kDa), anti-ER- α (66 kDa), anti-eNOS(140 KDa), anti-p-NFkB (65 KDa), anti-NFkB (65 KDa), anti-MyD88 (33 KDa), anti-TLR4 (95 KDa). Todos os anticorpos primários foram obtidos da empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Califórnia, EUA). A ligação dos anticorpos primários foi detectada com anticorpos secundários conjugados com peroxidase de rabanete, e as membranas foram processadas usando reagente de detecção por quimiluminescência. As autorradiografias geradas foram analisadas quantitativamente com o programa para densitometria ImageJ (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). Os pesos moleculares das bandas analisadas foram comparados a um marcador de peso molecular padrão (RPN 800 rainbow full range; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Os resultados de densidade óptica

(D.O.) de cada amostra foram normalizados pelo imunoconteúdo da β -tubulina e da α -actinina apresentados como porcentagem individual da D.O. sobre o total da D.O. do gel em análise.

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística realizada foi a mesma nos dois experimentos. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*. Os resultados que mostraram distribuição normal estão apresentados como média \pm desvio. Os valores de cada animal foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias e complementados pelo teste de *Student-Newman-Keuls*. Os desfechos que não apresentaram distribuição normal foram mostrados como medianas e intervalos interquartis. Para esses desfechos, foi utilizado o teste estatístico de comparações múltiplas de *Kruskal-Wallis*. O software utilizado para a realização da análise foi o *SigmaPlot*, versão 11.0. Foi considerada uma probabilidade de erro alfa menor ou igual que 0,05 ($P \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo foram descritos separadamente, conforme os dois experimentos apresentados anteriormente.

5.1 RESULTADOS OBTIDOS NO EXPERIMENTO I REFERENTE AO PULMÃO:

5.1.1 Atividade da enzima NADPH oxidase

A atividade enzimática da NADPH oxidase, enzima responsável pela geração do ânion radical superóxido, avaliada em homogeneizado de pulmão, aumentou 83% no grupo SM versus o grupo S, como visto na Figura 6.

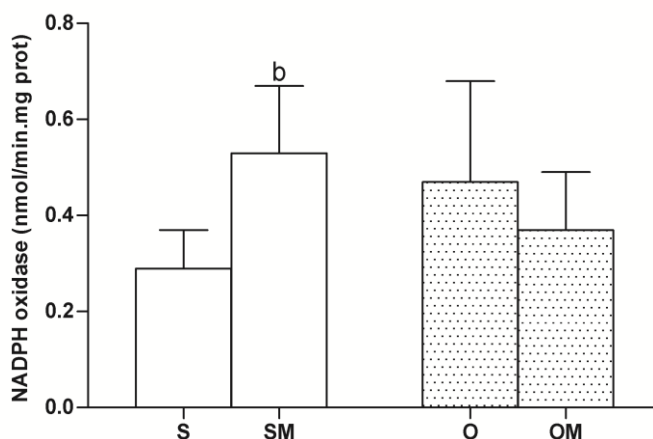


Figura 6 - Atividade da NADPH oxidase no pulmão.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, n=5-7/grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. ^bP<0,05 significativamente diferente quando comparado ao grupo S, ANOVA de duas vias com pós-teste de Student-Newman-Keuls.

5.1.2 Expressão e atividade da enzima SOD-1

A expressão da SOD-1 não mostrou diferença significativa entre os grupos (Figura 7).

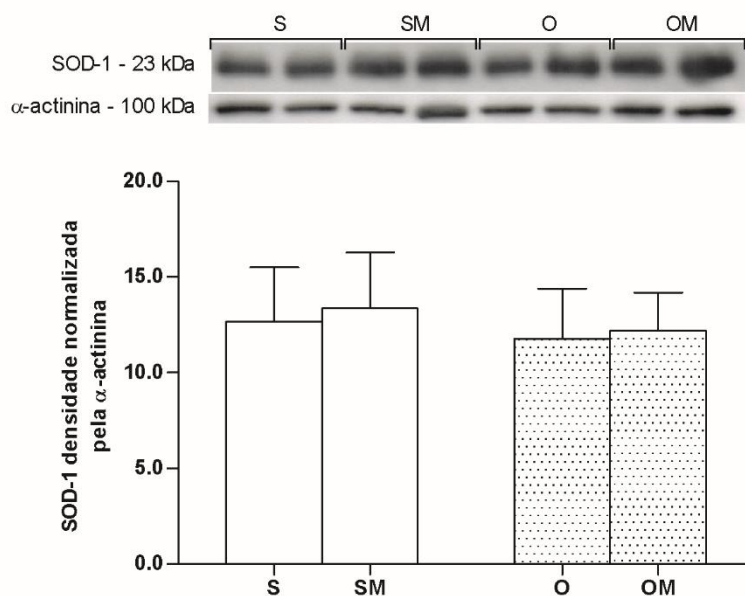


Figura 7 - Expressão da SOD-1 por Western Blot em homogeneizado de pulmão.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, n=3-4/grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. Não houve diferença significativa entre os grupos, conforme ANOVA de duas vias.

Entretanto, a atividade da SOD foi aumentada em 54% no grupo OM comparado ao O. Houve também um aumento significativo ($P < 0,05$) nos grupos SM e OM quando comparados aos grupos S e O (Figura 8).

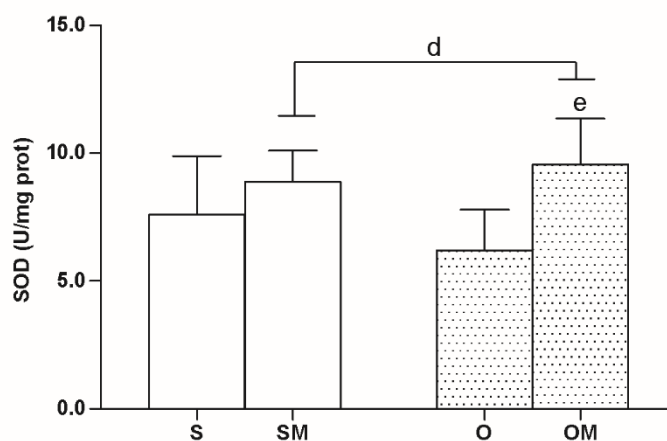


Figura 8 - Atividade da SOD no pulmão.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, $n=5-7$ /grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. ^d $P < 0,05$ significativamente diferente SM e OM versus S e O; ^e $P < 0,05$ significativamente diferente quando comparado ao grupo O, ANOVA de duas vias com pós-teste de Student-Newman-Keuls.

5.1.3 Atividade enzimática da NOS

A atividade da enzima NOS, que catalisa a produção de óxido nítrico, avaliada em homogeneizado de pulmão, foi significativamente maior nos grupos SM e OM ($P < 0,05$) quando comparada aos grupos S e O. Igualmente, houve um aumento de 85% e 60% no grupo OM, em relação aos grupos O e SM, respectivamente (Figura 9).

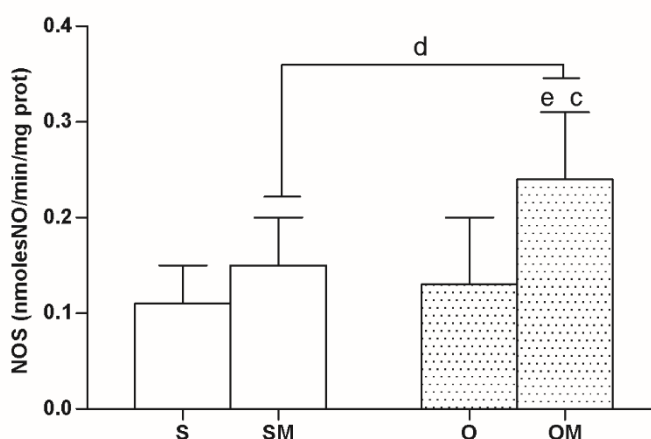


Figura 9 - Atividade da NOS no pulmão.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, $n=5-7$ /grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. $^{\circ}P < 0,05$ significativamente diferente quando comparado ao grupo SM; $^{\text{d}}P < 0,05$ significativamente diferente SM e OM versus S e O; $^{\text{e}}P < 0,05$ significativamente diferente quando comparado ao grupo O, ANOVA de duas vias com pós-teste de Student-Newman-Keuls.

5.1.4 Concentração de nitritos totais

De maneira oposta ao encontrado na atividade da enzima NOS, a monocrotalina foi eficaz em reduzir os nitritos totais nos grupos SM e OM ($P < 0,05$), quando relacionados aos grupos S e O. Além disso, diminuiu 31% no grupo SM versus o grupo S (Figura 10).

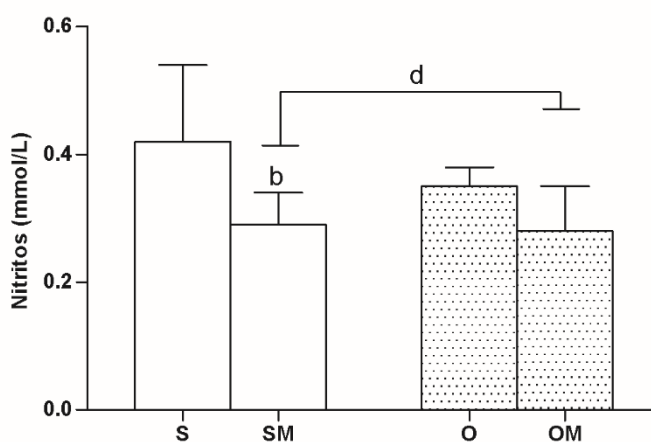


Figura 10 - Nitritos totais no pulmão.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, $n=5-7$ /grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. ^b $P < 0,05$ significativamente diferente quando comparado ao grupo S; ^d $P < 0,05$ significativamente diferente SM e OM versus S e O, ANOVA de duas vias com pós-teste de Student-Newman-Keuls.

5.1.5 Concentração do peróxido de hidrogênio

A análise realizada no homogeneizado de pulmão, para verificar a concentração do peróxido de hidrogênio, está mostrada na Figura 11. Não foi observada diferença significativa entre os grupos.

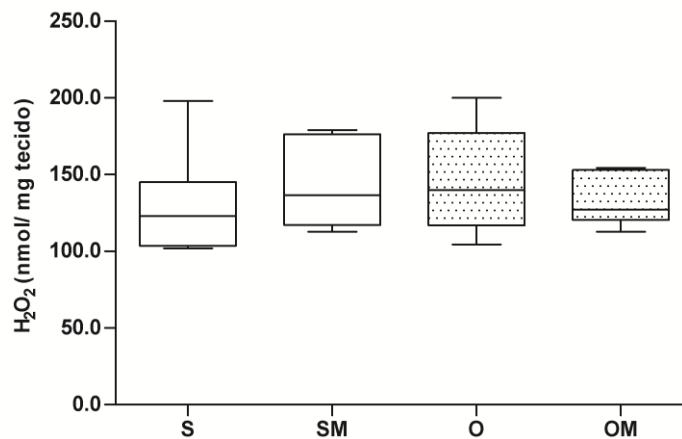


Figura 11 - Concentração de H₂O₂ em homogeneizado de pulmão.

Valores expressos como medianas e intervalos interquartis, n=5-7/grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. Não houve diferença significativa entre os grupos, conforme análise de variância Kruskal-Wallis P=0,769.

5.1.6 Atividade enzimática da CAT e expressão da Prx VI

Em relação à atividade da enzima CAT, que catalisa a conversão do H_2O_2 à água e oxigênio, apresentada na Figura 12, não foi observada diferença significativa entre os grupos.

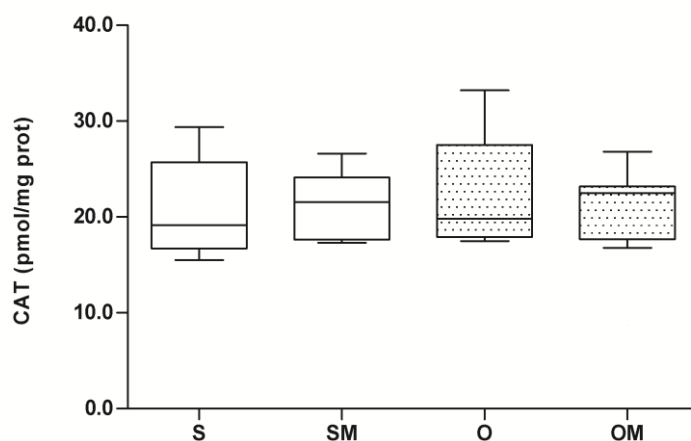


Figura 12 - Atividade da CAT em homogeneizado de pulmão.

Valores expressos como medianas e intervalos interquartis, n=5-7/grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. Não houve diferença significativa entre os grupos, conforme análise de variância Kruskal-Wallis $P=0,956$.

Da mesma forma, não foi verificada influência significativa, nem da monocrotalina nem da ovariectomia, na expressão proteica da Prx VI (Figura 13) nos distintos grupos. A Prx VI também reduz o H₂O₂ à água, trabalhando com pequenas concentrações de H₂O₂.

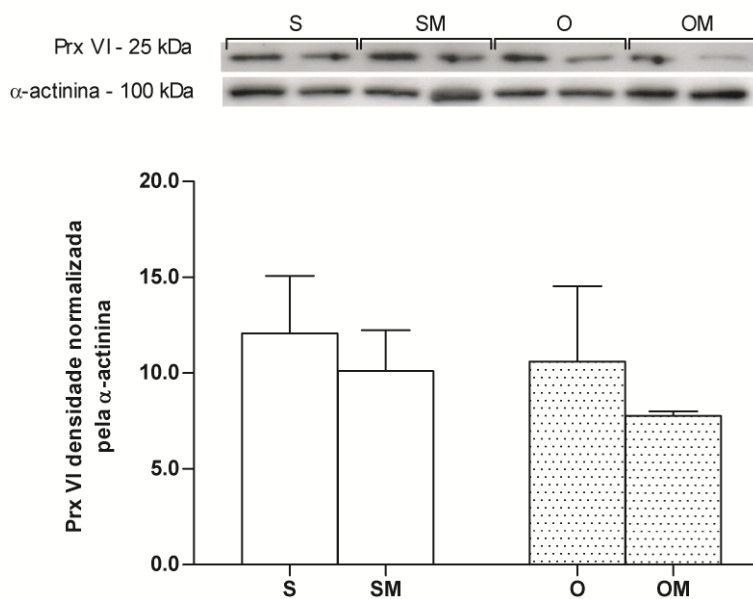


Figura 13 - Expressão da Prx VI por Western Blot em homogeneizado de pulmão.

Valores expressos como média ± desvio padrão, n=3-4/grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. Não houve diferença significativa entre os grupos, conforme ANOVA de duas vias.

5.1.7 Lipoperoxidação

A avaliação do dano oxidativo a lipídios ou lipoperoxidação, por meio do método de TBARS, mostrou que a ovariectomia (O e OM) aumentou o dano lipídico. Além disso, no grupo OM este aumento foi de 73% quando comparado ao grupo SM (Figura 14).

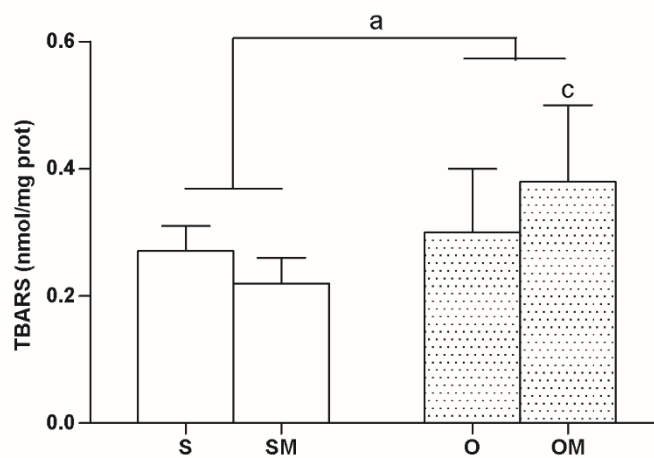


Figura 14 - Lipoperoxidação por TBARS no pulmão.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, n=5-7/grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. ^aP<0,05 – significativamente diferente O e OM versus S e SM; ^cP<0,05 – significativamente diferente quando comparado ao grupo SM, ANOVA de duas vias com pós-teste de Student-Newman-Keuls.

5.1.8 Expressão das proteínas ER- α e ER- β

A análise da expressão dos receptores nucleares de estrogênio ER- α e ER- β , é mostrada nas Figuras 15 e 16, respectivamente. Observou-se que nem a monocrotalina nem a ovariectomia, foram capazes de alterar de forma significativa a expressão destas proteínas no pulmão ($P < 0,05$).

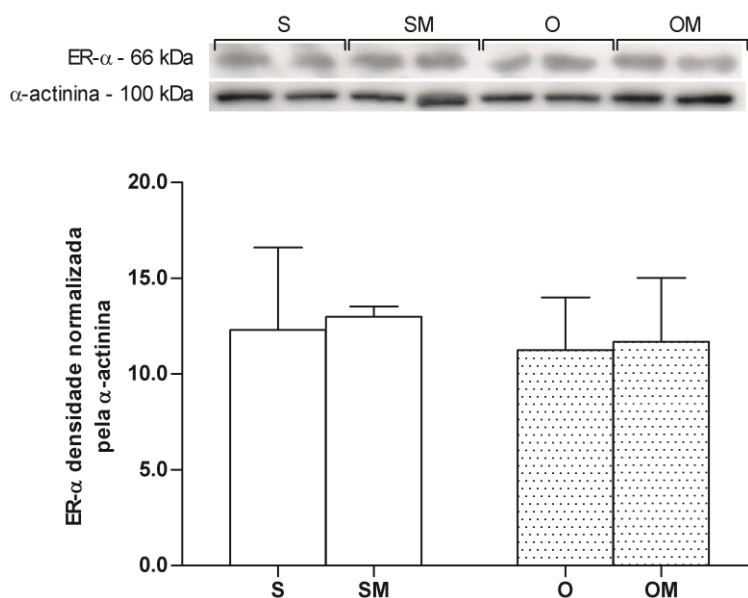


Figura 15 - Expressão do ER- α por Western Blot em homogeneizado de pulmão.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, $n=3-4$ /grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. Não houve diferença significativa entre os grupos, conforme ANOVA de duas vias.

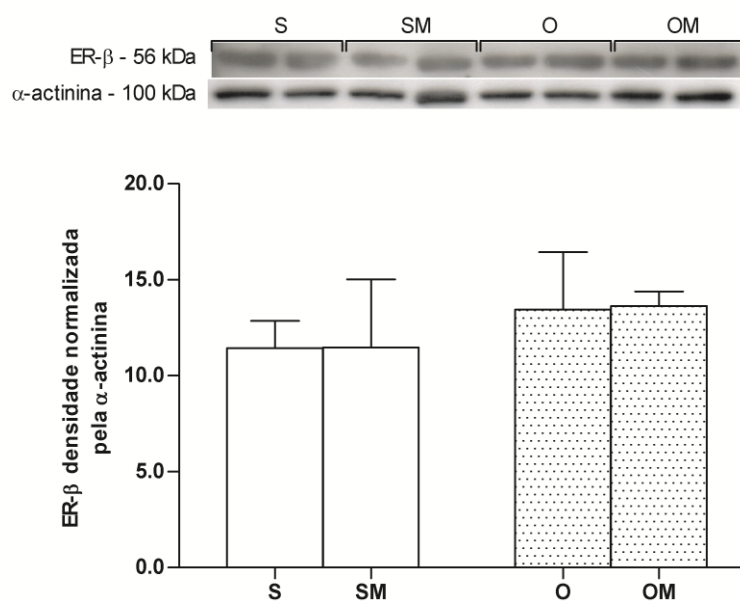


Figura 16 - Expressão do ER-β por Western Blot em homogeneizado de pulmão.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, n=3-4/grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. Não houve diferença significativa entre os grupos, conforme ANOVA de duas vias.

5.1.9 Dados histológicos

Na análise por hemotoxilina-eosina (Figura 17) nos pulmões, pode-se observar espessamento das paredes alveolares nos grupos SM, O e OM. As paredes arteriolares também se apresentaram espessadas nos grupos SM e OM. Além disso, pode-se observar maior infiltrado inflamatório nos grupos SM e OM, com manifestação discreta no grupo O.

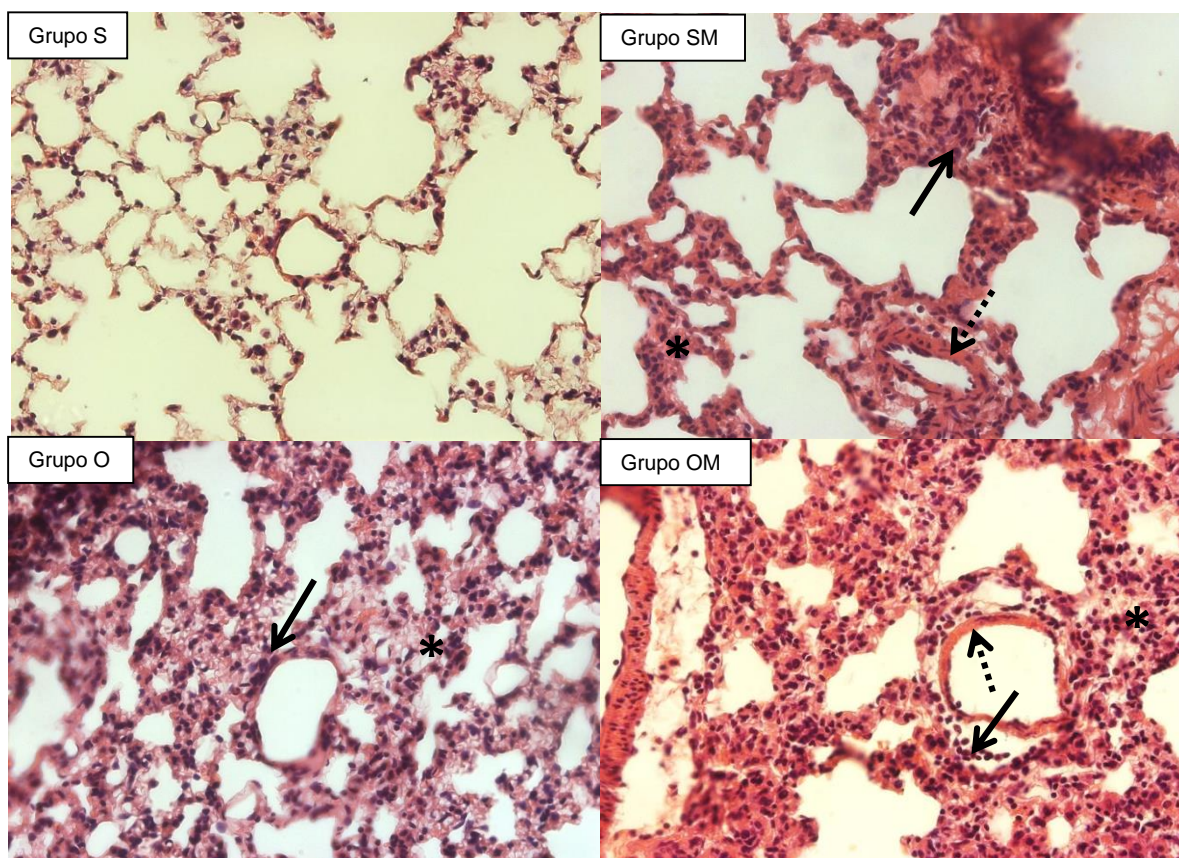


Figura 17 - Fotomicrografias representativas dos pulmões corados por hematoxilina-eosina (HE), 21 dias após indução da HAP por MCT.

Aumento: 1000x. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. n= 5-6

Espessamento das paredes alveolares = asterisco;

Espessamento das paredes arteriolares = seta pontilhada;

Infiltrado inflamatório = seta cheia.

Em relação à análise dos pulmões corados com picrossirius, pode-se observar espessamento das paredes alveolares e espessamento das paredes arteriolares, nos grupos SM e OM. O grupo OM apresentou maior deposição de fibras de colágeno perivascular e nas paredes alveolares (Figura 18).

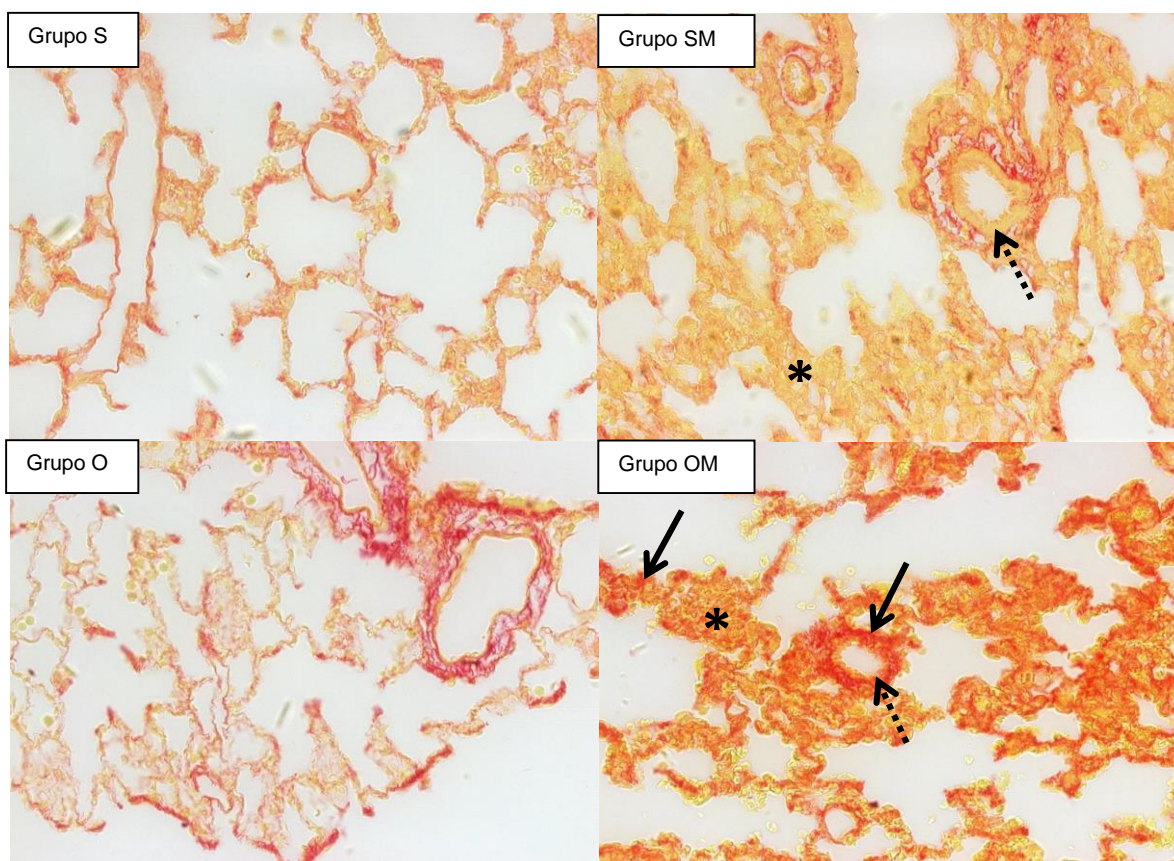


Figura 18 - Fotomicrografias representativas dos pulmões corados para picrossirius, 21 dias após indução da HAP por MCT.

Aumento: 400x. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. n= 5-6

Espessamento das paredes alveolares = asterisco;

Espessamento das paredes arteriolares = seta pontilhada;

Deposição de colágeno = seta cheia.

5.1.10 Expressão de proteínas envolvidas com inflamação – TLR4, MyD88 e NFkB

A expressão da proteína TLR4, importante na ativação do sistema imune inato, mostrou uma redução significativa ($P < 0,05$) nos grupos com monocrotalina (SM e OM), em relação aos grupos sem a droga (S e O) (Figura 19).

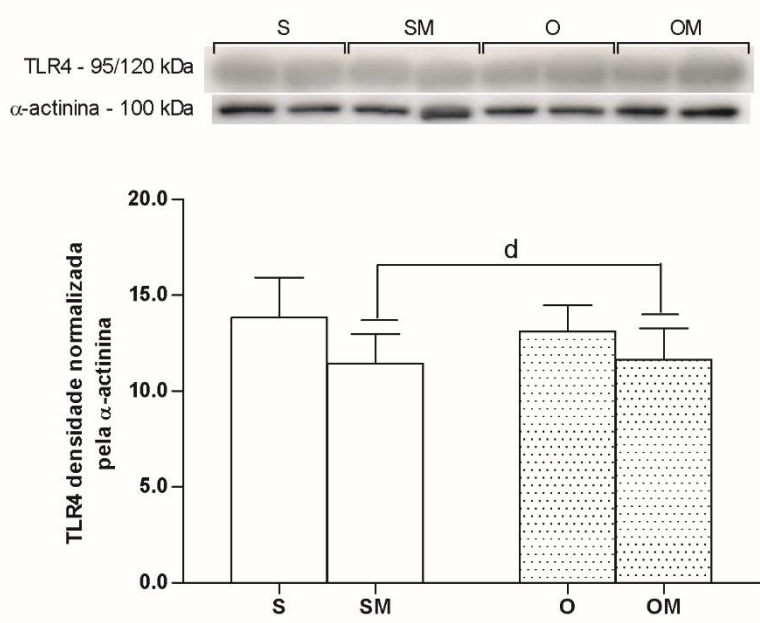


Figura 19 - Expressão do TLR4 por Western Blot em homogeneizado de pulmão.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, $n=3-4$ /grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. ^d $P < 0,05$ – significativamente diferente SM e OM versus S e O, ANOVA de duas vias com pós-teste de Student-Newman-Keuls.

A expressão da proteína MyD88, não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 20).

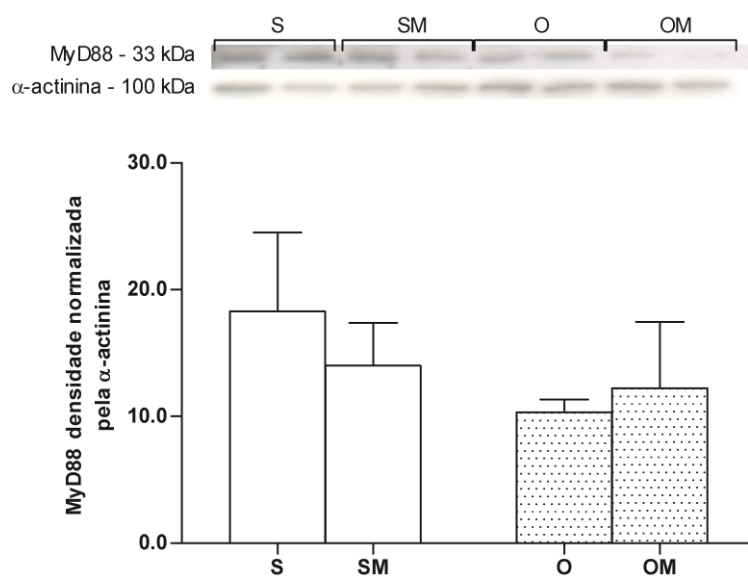


Figura 20 - Expressão da MyD88 por Western Blot em homogeneizado de pulmão.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, n=3-4/grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. Não houve diferença significativa em ambos os grupos, conforme ANOVA de duas vias.

Agora, no que diz respeito ao NFkB, um fator de transcrição redox-sensível, houve uma redução de 48% no grupo SM versus o grupo S. Além disso, nos grupos com monocrotalina (SM e OM), houve diminuição da expressão do NFkB, em relação aos grupos sem a droga (S e O). A ovariectomia (grupos O e OM) também foi eficiente em diminuir a expressão desta proteína, como visto na figura 21.

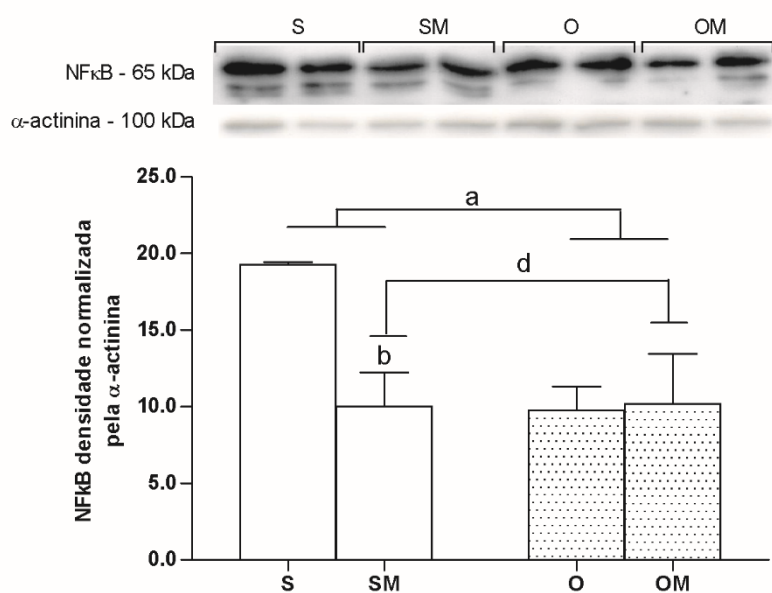


Figura 21 - Expressão do NFkB por Western Blot em homogeneizado de pulmão.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, n=3-4/grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. aP<0,05 significativamente diferente O e OM versus S e SM; bP<0,05 significativamente diferente quando comparado ao grupo S; dP<0,05 significativamente diferente SM e OM versus S e O, ANOVA de duas vias com pós-teste de Student-Newman-Keuls.

Além disso, a expressão da p-NFkB e a relação desta proteína com o NFkB, não mostrou diferença significativa nos distintos grupos (Figura 22 e 23).

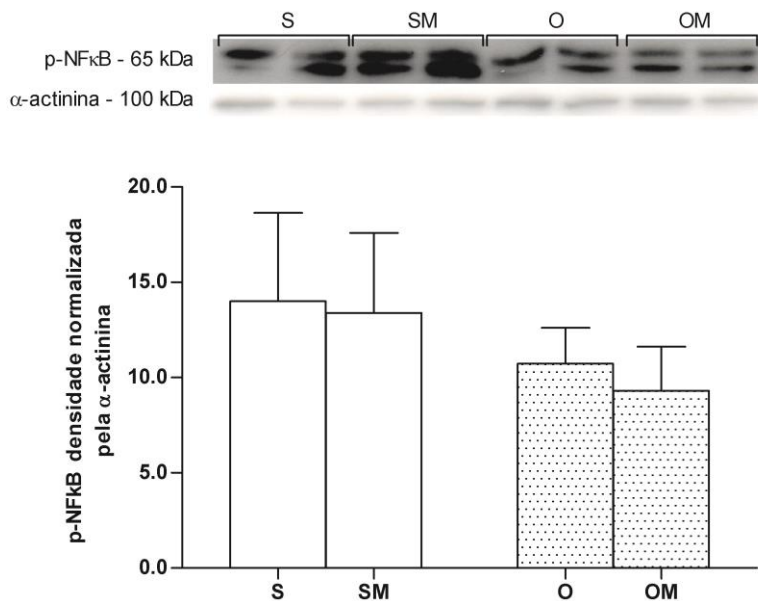


Figura 22- Expressão da p-NFkB por Western Blot em homogeneizado de pulmão.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, n=3-4/grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. Não houve diferença significativa em ambos os grupos, conforme ANOVA de duas vias.

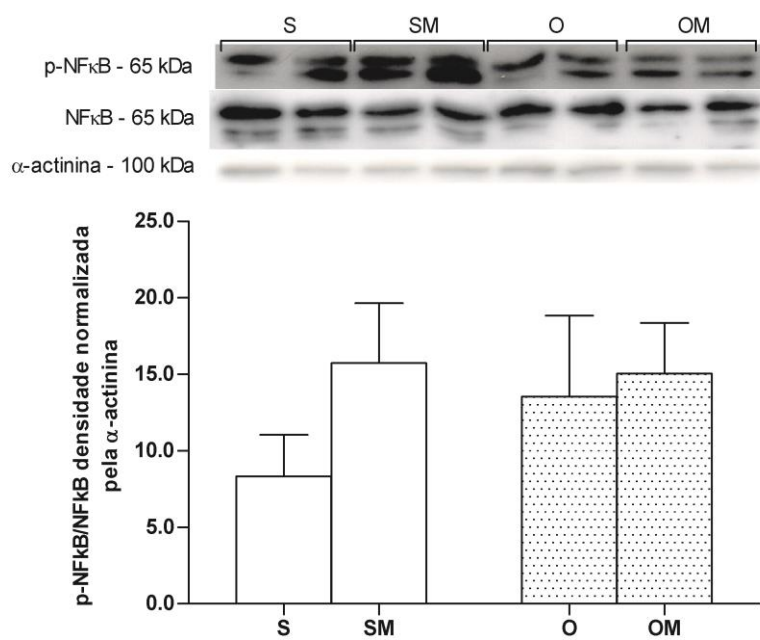


Figura 23 - Expressão da p-NFκB/NFκB por Western Blot em homogeneizado de pulmão.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, n=3-4/grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. Não houve diferença significativa em ambos os grupos, conforme ANOVA de duas vias.

5.2 RESULTADOS OBTIDOS NO EXPERIMENTO II REFERENTE AO VENTRÍCULO DIREITO:

5.2.1 Análises ecocardiográficas

A figura 24 mostra registros ecocardiográficos representativos de cada um dos grupos experimentais, mostrando o perfil de fluxo através da artéria pulmonar. Ao contrário do observado em ratos machos, não se mostra um platô na onda de fluxo, o qual é conhecido como "late systolic notch". Quando quantificada a razão entre o tempo de aceleração (TAC) pelo tempo de ejeção (TEJ) do fluxo pela artéria pulmonar, uma forma não invasiva de determinar aumento na resistência vascular pulmonar (tabela 2), não foi observada diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$). Isto ocorreu também com o volume sistólico e o débito cardíaco do VD.

Tabela 2 - Parâmetros ecocardiográficos analisados 21 dias após administração de monocrotalina ou salina

	S	SM	O	OM
TAC/TEJ (s/s)	0,29 ± 0,05	0,28 ± 0,07	0,29 ± 0,09	0,28 ± 0,10
VS (mL)	0,21 ± 0,05	0,24 ± 0,03	0,23 ± 0,05	0,25 ± 0,04
DC (mL/min)	47,57 ± 12,07	52,75 ± 7,54	55,17 ± 14,34	59,88 ± 9,58

Valores expressos como média ± desvio padrão, n=6-7/grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. TAC/TEJ, tempo de aceleração (TAC) pelo tempo de ejeção (TEJ) do fluxo pela artéria pulmonar; VS, volume sistólico do VD; DC, débito cardíaco do VD. Não houve diferença significativa em ambos os grupos, conforme ANOVA de duas vias.

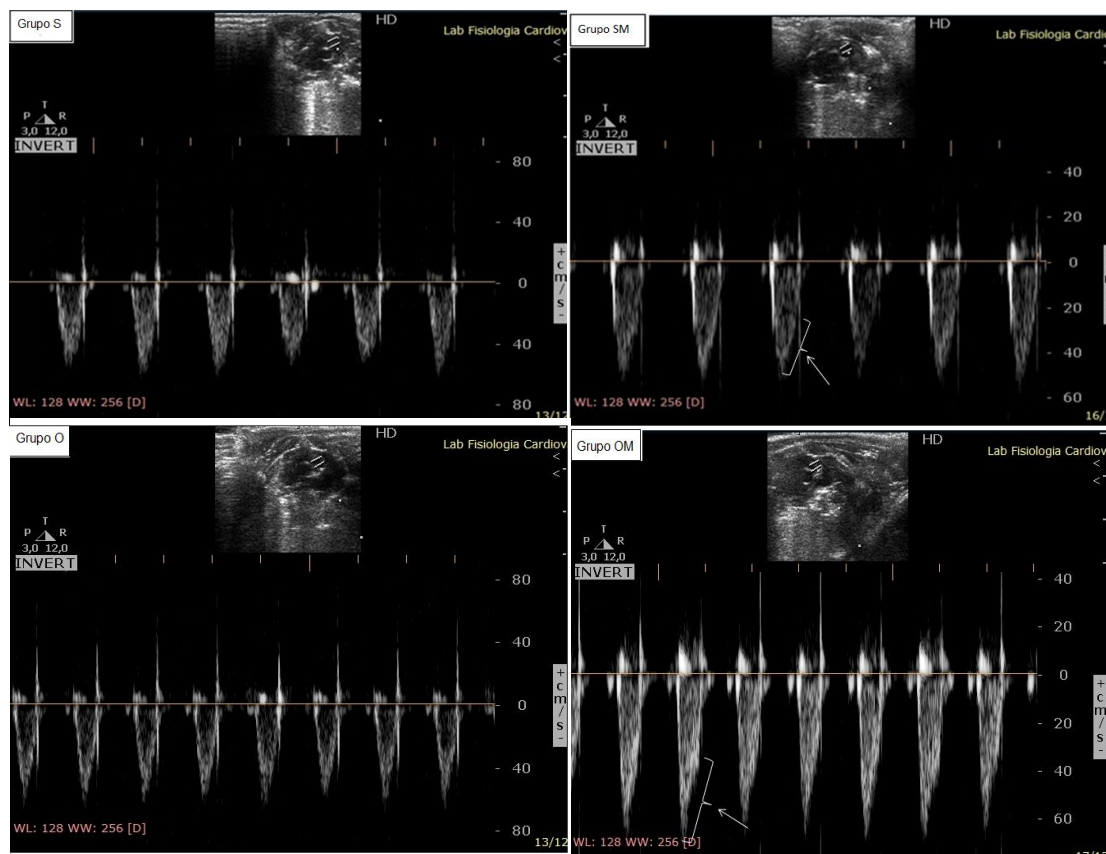


Figura 24 - Ecocardiografia representativa do fluxo pela artéria pulmonar 21 dias após administração de monocrotalina ou salina

A seta representa alteração do padrão de fluxo através da artéria pulmonar, caracterizando leve aumento da resistência pulmonar nos grupos com monocrotalina, em relação a seus respectivos controles, porém sem diferença significativa.

5.2.2 Avaliação hemodinâmica do VD

A verificação do registro hemodinâmico da PSVD e PDFVD foi realizada através de cateterismo do ventrículo direito. Com base nestes resultados, foi calculada a pressão média da artéria pulmonar ($PmAP = 0,61 \cdot PSVD + 2$), conforme descrito na metodologia. Não foi observada diferença significativa na PDFVD nos distintos grupos. A monocrotalina foi capaz de aumentar a PSVD e a PmAP (SM e OM) significativamente ($P < 0,05$).

Além disso, também foi observado um aumento de 38% no grupo SM versus S e de 48% no grupo OM versus O, na PSVD, bem como, um aumento de 34% no grupo SM versus S e de 42% no grupo OM versus O, na PmAP (Tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros hemodinâmicos analisados 21 dias após administração de monocrotalina ou salina em ventrículo direito de ratas

	S	SM	O	OM
PDFVD (mmHg)	2,16 ± 1,06	2,85 ± 0,49	2,24 ± 0,81	3,30 ± 1,28
PSVD (mmHg)	25,98 ± 6,8	35,88 ± 7,07 ^{bd}	25,18 ± 4,87	37,22 ± 12,14 ^{de}
PmAP (mmHg)	17,85 ± 4,15	23,89 ± 4,31 ^{bd}	17,36 ± 2,97	24,71 ± 7,41 ^{de}

Valores expressos como média ± desvio padrão, n=6-7/grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. PDFVD, pressão diastólica final do ventrículo direito; PSVD, pressão sistólica do ventrículo direito; PmAP, pressão média da artéria pulmonar. bP<0,05 significativamente diferente quando comparado ao grupo S; dP<0,05 significativamente diferente SM e OM versus S e O; eP<0,05 significativamente diferente quando comparado ao grupo O, ANOVA de duas vias com pós-teste de Student-Newman-Keuls.

5.2.3 Avaliações morfométricas

A média da massa corporal final mostrou-se sem diferença significativa entre os grupos. Da mesma forma, a hipertrofia cardíaca analisada pela relação da massa do VD pela massa corporal final, como também pela relação da massa do VD pelo comprimento da tibia não apresentou diferença ($P < 0,05$). Com o objetivo de verificar a eficácia da ovariectomia, foi analisado o peso úmido dos cornos uterinos dos animais. O peso do útero apresentou-se diminuído em 71% no grupo O, em relação ao S, e em 67% no grupo OM, em relação ao SM (Tabela 4).

Tabela 4 - Avaliações morfométricas analisadas 21 dias após administração de monocrotalina ou salina em ventrículo direito de ratas

	S	SM	O	OM
MC final (g)	255,14 ± 17,38	246,14 ± 20,24	262,83 ± 26,72	251,67 ± 19,93
VD (g)	0,148 ± 0,02	0,154 ± 0,02	0,152 ± 0,03	0,166 ± 0,02
VD/MC final (mg/g)	0,58 ± 0,06	0,63 ± 0,08	0,58 ± 0,05	0,67 ± 0,13
VD/tibia (mg/mm)	4,22 ± 0,68	4,44 ± 0,44	4,29 ± 0,54	4,84 ± 0,76
Peso do útero (mg)	0,48 ± 0,09	0,43 ± 0,07	0,14 ± 0,03 ^{ab}	0,14 ± 0,03 ^{ac}

Valores expressos como média ± desvio padrão, n=6-7/grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. MC, massa corporal; VD, ventrículo direito.^a $P < 0,05$ significativamente diferente O e OM versus S e SM; ^b $P < 0,05$ significativamente diferente quando comparado ao grupo S; ^c $P < 0,05$ significativamente diferente quando comparado ao grupo SM, ANOVA de duas vias com pós-teste de Student-Newman-Keuls.

5.2.4 Determinação da oxidação de proteínas e lipoperoxidação

A verificação de dano oxidativo a proteínas, avaliada pela técnica das carbonilas, bem como, a injúria causada a lipídios, determinada pela técnica de quimiluminescência, não apresentaram diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$), observado nas figuras 25 e 26.

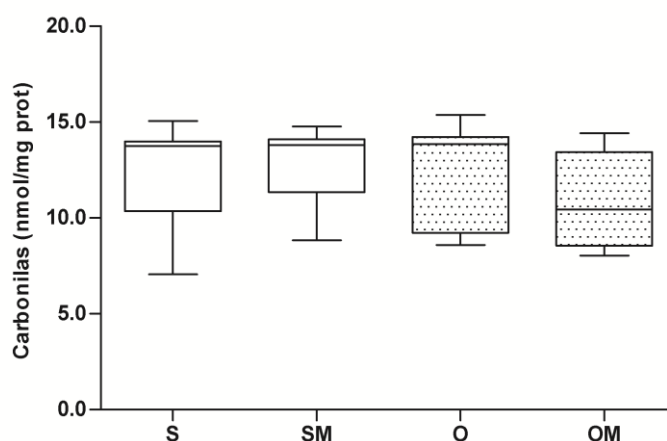


Figura 25 - Oxidação a proteínas por carbonilas em homogeneizado de VD.

Valores expressos como medianas e intervalos interquartis, $n=5-7$ /grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. Não houve diferença significativa entre os grupos, conforme análise de variância Kruskal-Wallis $P=0,128$.

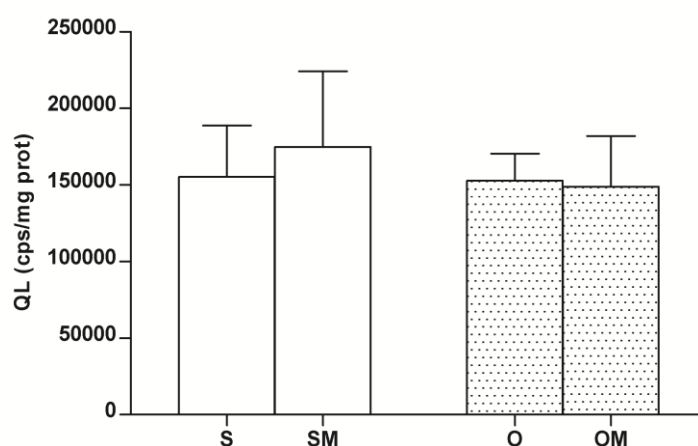


Figura 26 - Dano a lipídios por quiluminescência em homogeneizado de VD.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, n=5-7/grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. QL, quiluminescência. Não houve diferença significativa entre os grupos, conforme ANOVA de duas vias.

5.2.5 Avaliações Bioquímicas

As análises bioquímicas realizadas em homogeneizado do VD foram expostas na tabela 5. A verificação da atividade da NOS no VD mostrou uma redução de 33% no grupo SM e 31% no grupo O quando comparada ao grupo S. Além disso, a ovariectomia e a monocrotalina foram eficientes em reduzir a atividade desta enzima ($P < 0,05$). Em relação à atividade da SOD, foi observado um aumento significativo nos grupos SM e OM versus S e O.

A concentração de H_2O_2 também mostrou um aumento no grupo SM e OM em relação ao grupo S e O. Associado a este resultado, verificou-se um acréscimo de 36% no grupo SM quando comparado ao grupo S e de 37%, no grupo OM versus O.

Na sequência, a atividade enzimática antioxidante da CAT e da GPx apresentaram-se significativamente elevadas nos grupos que receberam a monocrotalina (P<0,05). Também houve um aumento de 47% da CAT quando comparado o grupo SM versus S, e de 52% da GPx no grupo SM versus S.

Tabela 5 - Avaliações bioquímicas analisadas 21 dias após administração de monocrotalina ou salina em ventrículo direito de ratas

	S	SM	O	OM
NOS(nmolesNO/min/mg prot)	1,18 ± 0,43	0,79 ± 0,15 ^{bd}	0,81 ± 0,22 ^{ab}	0,57 ± 0,14 ^{ad}
SOD (U/mg prot)	9,74 ± 2,04	11,26 ± 1,28 ^d	9,99 ± 1,44	10,92 ± 2,15 ^d
H ₂ O ₂ (nmol/mg tecido)	192,7 ± 45,8	261,9 ± 58,2 ^{bd}	186,1 ± 80,7	254,4 ± 72,6 ^{de}
CAT (pmol/mg prot)	19,57 ± 7,92	28,83 ± 9,02 ^{bd}	21,41 ± 7,64	25,89 ± 6,24 ^d
GPx (nmol/min/mg prot)	26,58 ± 8,59	40,30 ± 9,04 ^{bd}	30,50 ± 7,13	29,82 ± 7,22 ^d

Valores expressos como média ± desvio padrão, n=6-7/grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. NOS, óxido nítrico sintase; SOD, superóxido dismutase; H₂O₂, peróxido de hidrogênio; CAT, catalase; GPx, glutathiona peroxidase. aP<0,05 significativamente diferente O e OM versus S e SM; bP<0,05 significativamente diferente quando comparado ao grupo S; dP<0,05 significativamente diferente SM e OM versus S e O; eP<0,05 significativamente diferente quando comparado ao grupo O, ANOVA de duas vias com pós-teste de Student-Newman-Keuls.

5.2.6 Expressão das proteínas SOD-1, CAT, GPx-1 e eNOS

A expressão da enzima SOD-1, importante defesa antioxidante e catalisadora da dismutação do ânion radical superóxido, mostrou-se diminuída nos grupos ovariectomizados O e OM, do mesmo modo que reduziu 46% no grupo OM em relação ao grupo SM. Além disso, foi observado um aumento de 29% no grupo SM versus o grupo S (Figura 27).

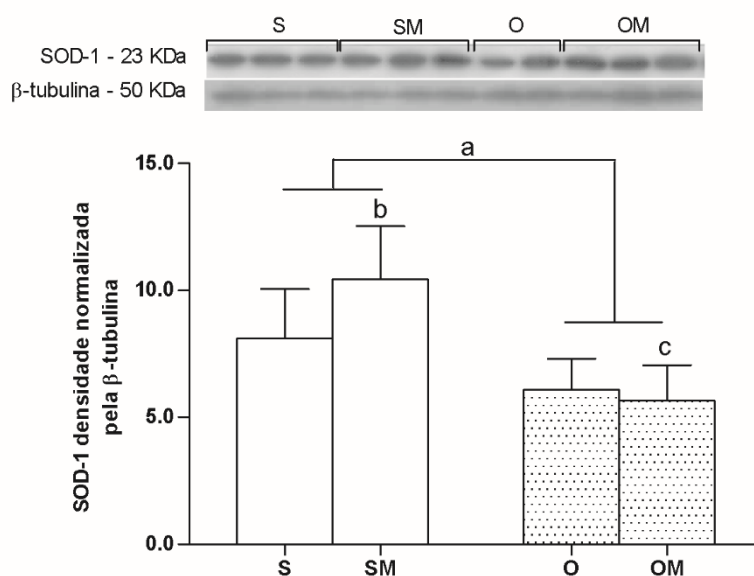


Figura 27 - Expressão da SOD-1 por Western Blot em homogeneizado de VD.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, $n=5-6$ /grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. a $P<0,05$ significativamente diferente O e OM versus S e SM; b $P<0,05$ significativamente diferente quando comparado ao grupo S; c $P<0,05$ significativamente diferente quando comparado ao grupo SM, ANOVA de duas vias com pós-teste de Student-Newman-Keuls.

A expressão das enzimas de defesas antioxidantes CAT e GPx-1, ambas participantes da conversão do H_2O_2 à água e oxigênio, não mostraram diferença significativa entre os grupos. Estes resultados encontram-se nas figuras 28 e 29, respectivamente.

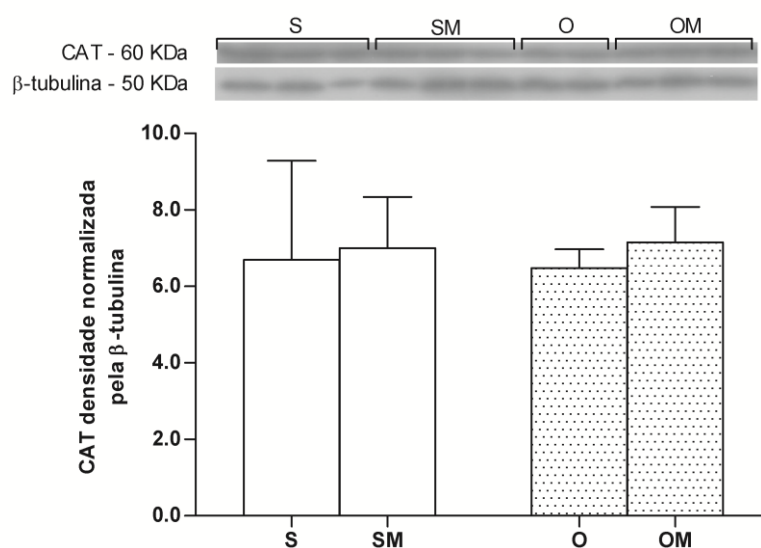


Figura 28 - Expressão da CAT por Western Blot em homogeneizado de VD.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, n=5-6/grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. Não houve diferença significativa entre os grupos, conforme ANOVA de duas vias.

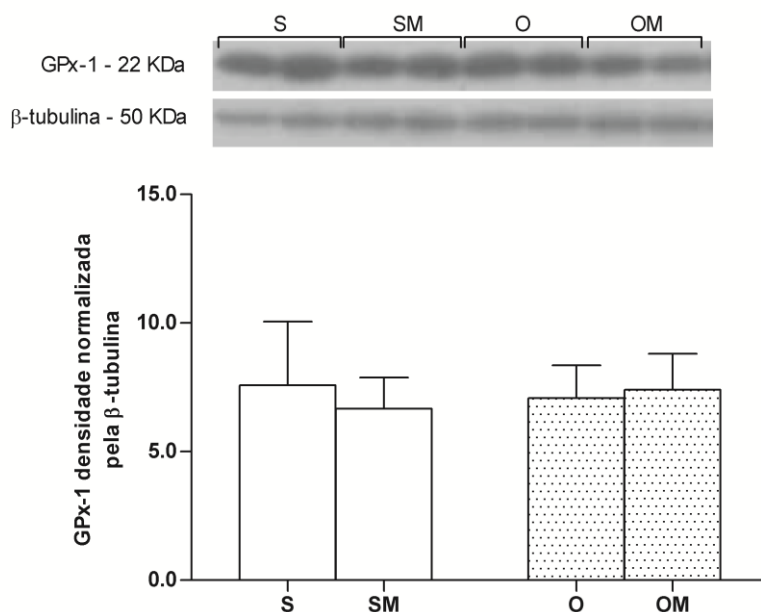


Figura 29 - Expressão da GPx-1 por Western Blot em homogeneizado de VD.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, n=5-6/grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. Não houve diferença significativa entre os grupos, conforme ANOVA de duas vias.

O mesmo comportamento, verificado nas proteínas CAT e GPx-1, foi observado na expressão da enzima catalisadora da síntese de NO, na sua isoforma eNOS (Figura 30).

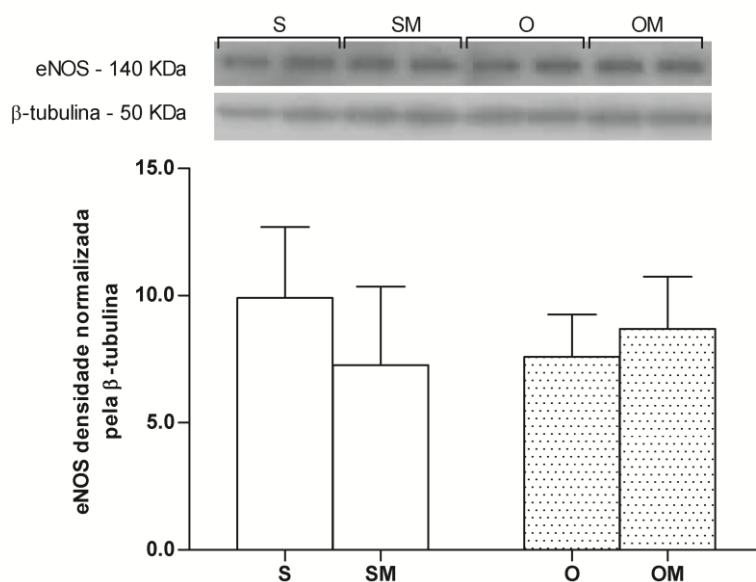


Figura 30 - Expressão da eNOS por Western Blot em homogeneizado de VD.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, n=5-6/grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. Não houve diferença significativa entre os grupos, conforme ANOVA de duas vias.

5.2.7 Expressão das proteínas Nrf2, HO-1, Trx-1, Prx VI e Grx-1

A expressão do Nrf2, fator de transcrição que regula a expressão de proteínas antioxidantes, mostrou-se diminuído nos grupos ovariectomizados (O e OM), em relação aos seus controles (S e SM) (Figura 31).

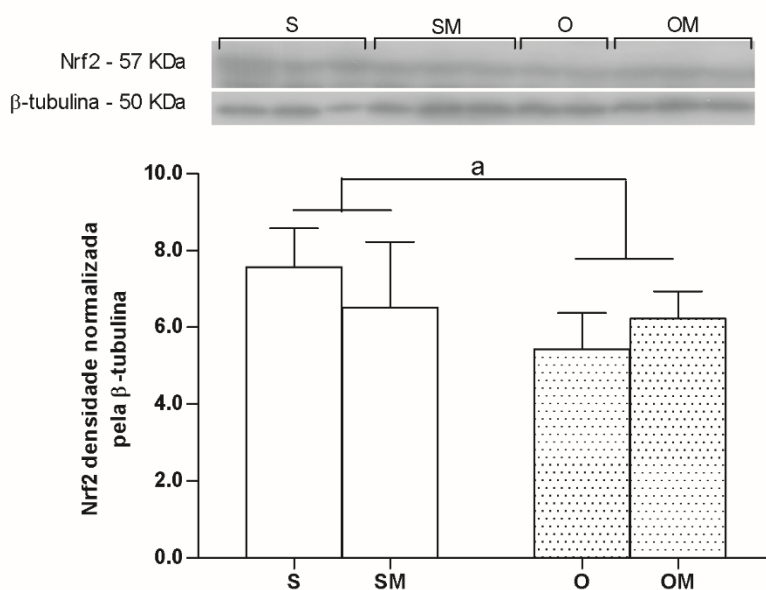


Figura 31 - Expressão do Nrf2 por Western Blot em homogeneizado de VD.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, n=5-6/grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. ^aP<0,05 significativamente diferente O e OM versus S e SM, ANOVA de duas vias com pós-teste de Student-Newman-Keuls.

A expressão da enzima HO-1, induzida pelo estresse oxidativo, apresentou uma redução de 63% no grupo SM quando comparada ao grupo S. A monocrotalina (grupos SM e OM) foi eficaz em reduzir significativamente ($P < 0,05$) a expressão desta enzima, em relação aos grupos sem a droga (S e O). Apesar disto, foi observado um aumento de 85% no grupo OM versus SM (Figura 32).

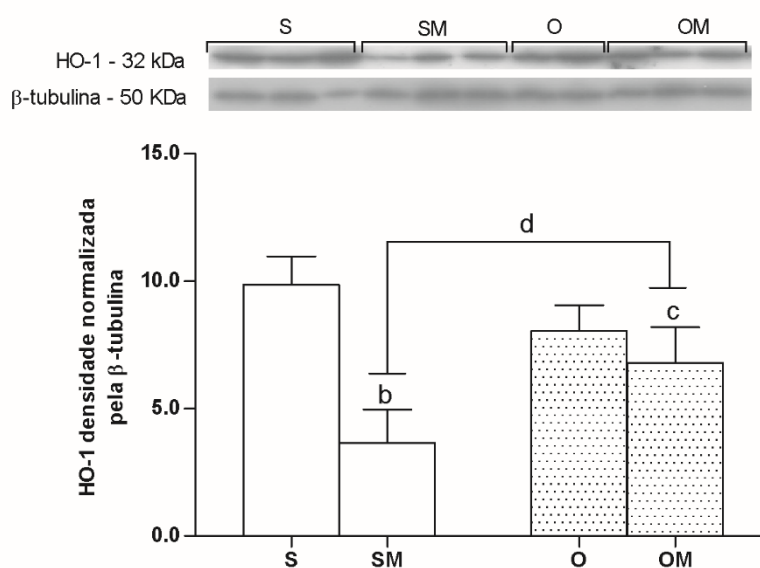


Figura 32 - Expressão da HO-1 por Western Blot em homogeneizado de VD.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, $n=5-6$ /grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. ^b $P < 0,05$ significativamente diferente quando comparado ao grupo S; ^c $P < 0,05$ significativamente diferente quando comparado ao grupo SM; ^d $P < 0,05$ significativamente diferente SM e OM versus S e O, ANOVA de duas vias com pós-teste de Student-Newman-Keuls.

A enzima Trx-1, importante para manutenção do ambiente redox, mostrou um comportamento semelhante ao da HO-1, isto é, a monocrotalina foi eficaz em reduzir significativamente a expressão desta enzima ($P < 0,05$). No entanto, a redução foi de 53% no grupo SM em relação ao grupo S, como também foi observado um aumento de 30% no grupo OM versus o grupo SM (Figura 33).

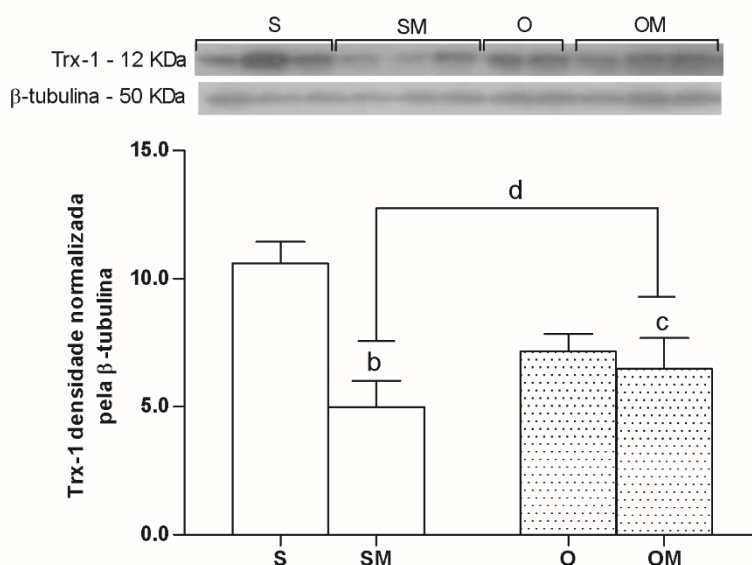


Figura 33 - Expressão da Trx-1 por Western Blot em homogeneizado de VD.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, $n=5-6$ /grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. ^b $P < 0,05$ significativamente diferente quando comparado ao grupo S; ^c $P < 0,05$ significativamente diferente quando comparado ao grupo SM; ^d $P < 0,05$ significativamente diferente SM e OM versus S e O, ANOVA de duas vias com pós-teste de Student-Newman-Keuls.

A expressão da enzima Prx VI, proteína envolvida na redução de peróxido de hidrogênio à água, apresentou uma diminuição significativa ($P < 0,05$) nos grupos ovariectomizados (O e OM), em relação aos controles (S e SM). A Prx VI diminuiu 34% no grupo OM, quando comparado ao grupo SM (Figura 34).

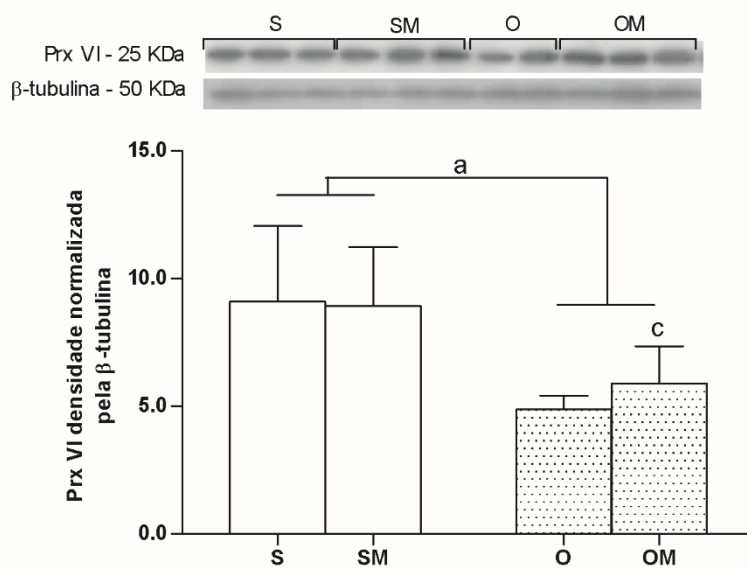


Figura 34 - Expressão da Prx VI por Western Blot em homogeneizado de VD.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, $n=5-6$ /grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. ^a $P < 0,05$ significativamente diferente O e OM versus S e SM; ^c $P < 0,05$ significativamente diferente quando comparado ao grupo SM, ANOVA de duas vias com pós-teste de Student-Newman-Keuls.

A expressão da enzima antioxidante Grx-1, importante na redução de proteínas contendo tióis oxidados, não mostrou diferença significativa entre os grupos (Figura 35).

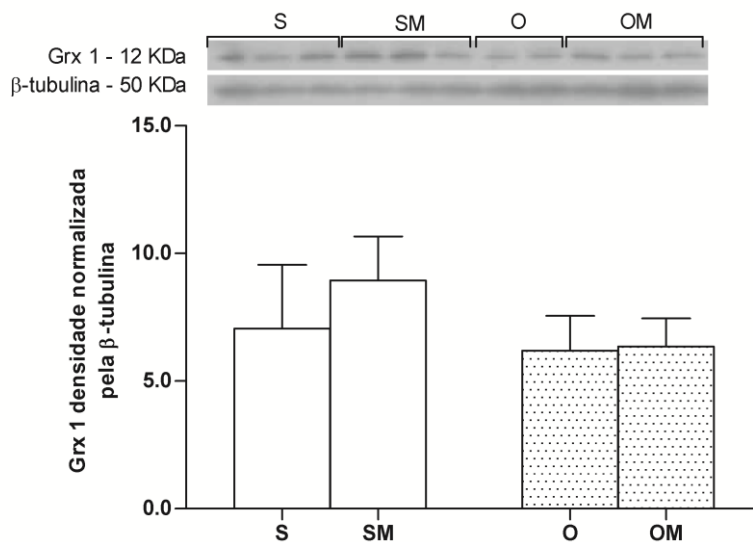


Figura 35 - Expressão da Grx-1 por Western Blot em homogeneizado de VD.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, n=5-6/grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. Não houve diferença significativa entre os grupos, conforme ANOVA de duas vias.

5.2.8 Expressão dos receptores ER- α e ER- β

A expressão dos receptores nucleares de estrogênio ER- α e ER- β , estão apresentadas nas figuras 36 e 37, respectivamente.

Na análise do ER- α , foi notado um aumento significativo ($P < 0,05$) nos grupos que receberam a monocrotalina (SM e OM), quando comparados aos seus controles sem a droga (S e O). Também houve um incremento de 70% no grupo SM versus S. Salienta-se que não houve diferença estatística no grupo OM versus o grupo O.

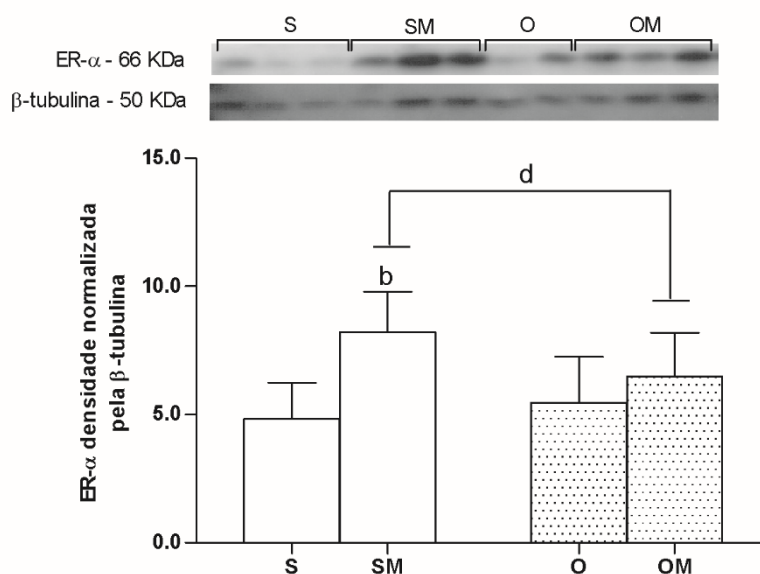


Figura 36 - Expressão do ER- α por Western Blot em homogeneizado de VD.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, $n=5-6$ /grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. ^b $P < 0,05$ significativamente diferente quando comparado ao grupo S; ^d $P < 0,05$ significativamente diferente SM e OM versus S e O, ANOVA de duas vias com pós-teste de Student-Newman-Keuls.

Seguindo a mesma tendência, a monocrotalina foi capaz de aumentar a expressão do ER- β , significativamente ($P < 0,05$). A ovariectomia também aumentou a expressão do ER- β . Ocorreu um incremento de 67% no grupo OM comparado ao grupo O.

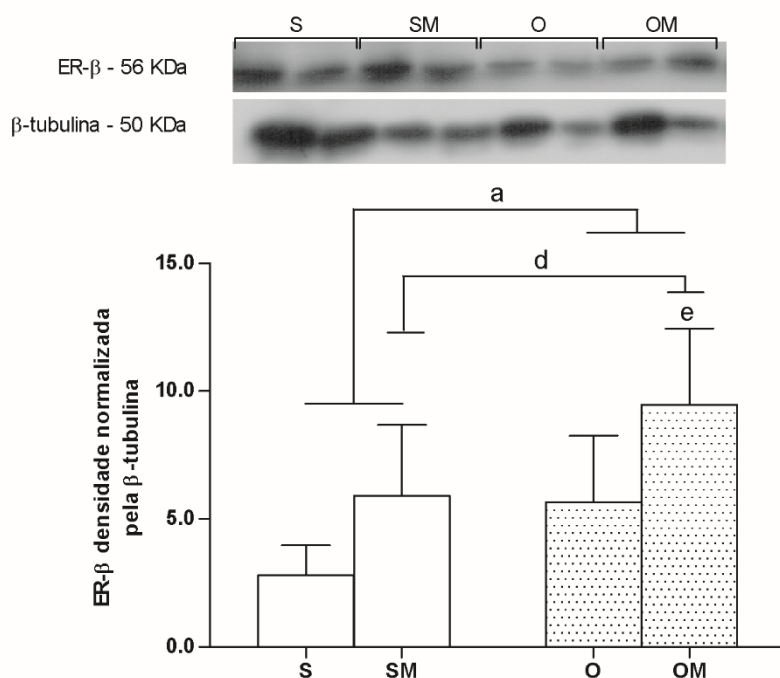


Figura 37 - Expressão do ER- β por Western Blot em homogeneizado de VD.

Valores expressos como média \pm desvio padrão, $n=5-6$ /grupo. S=sham; SM=sham+monocrotalina; O=ovariectomia; OM=ovariectomia+monocrotalina. ^a $P < 0,05$ significativamente diferente O e OM versus S e SM; ^d $P < 0,05$ significativamente diferente SM e OM versus S e O; ^e $P < 0,05$ significativamente diferente quando comparado ao grupo O, ANOVA de duas vias com pós-teste de Student-Newman-Keuls.

6 DISCUSSÃO CONCLUSIVA

Tendo em vista o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese da HAP, o presente trabalho explorou alguns aspectos deste fenômeno em relação ao remodelamento pulmonar e do ventrículo direito em modelo experimental. A grande maioria da informação disponível na literatura é proveniente de experimentos realizados em machos, sendo que pouco se sabe a respeito da influência dos hormônios ovarianos no estresse oxidativo e seu impacto nas alterações decorrentes da HAP em fêmeas. Desta forma, esta tese foi dividida em dois experimentos, sendo que o primeiro abordou o estresse oxidativo em tecido pulmonar e o segundo, sua repercussão sobre o ventrículo direito de ratas com HAP induzida por MCT. A discussão dos resultados seguirá esta ordem.

Torna-se cada vez mais claro que a produção elevada de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são subjacentes à patogênese da HAP (TABIMA; FRIZZELL; GLADWIN, 2012). A partir de alterações no equilíbrio do estado redox celular, surgem muitas respostas efetoras que incluem, entre outras, a diferenciação celular, a proliferação, a inflamação, e a expressão de genes e antioxidantes. O desequilíbrio na homeostase redox pode levar à disfunção endotelial, causando remodelamento pulmonar observado na HAP (DEMARCO et al., 2008).

Desta forma, no primeiro experimento proposto nesta tese, foi explorado o papel do estresse oxidativo e sua repercussão no remodelamento estrutural pulmonar em ratas com HAP induzida por MCT, assim como na sinalização para inflamação. A administração de MCT aumenta o estresse oxidativo pulmonar e reduz a

biodisponibilidade de óxido nítrico, em ratos machos (LUDKE et al., 2010). No entanto, há poucos estudos na literatura explorando o estresse oxidativo em pulmão de ratas neste modelo (BAL et al., 2013).

Conhecida a diversidade de fatores que provocam a HAP, o resultado comum de todas as formas é a elevação da resistência vascular pulmonar, mediada por vasoconstrição e proliferação da vasculatura pulmonar. Sabe-se que o tônus vascular pulmonar é influenciado pelo balanço entre vasodilatadores (como o óxido nítrico) e vasoconstritores (como a endotelina-1) e que a biodisponibilidade destes varia de acordo com o estado redox da célula. O aumento da produção de EROs, em especial do ânion radical superóxido, promove aumento da vasoconstrição e disfunção endotelial (MANDEGAR et al., 2004; WEDGWOOD et al., 2001).

Em células endoteliais, as fontes mais importantes de geração de EROs, incluem NADPH oxidase (Nox), xantina oxidase, mitocôndrias e, em certas circunstâncias, a NOS desacoplada. A Nox também gera EROs em células musculares lisas vasculares e fibroblastos (MONTEZANO; TOUYZ, 2012). Evidência indica que os sistemas de oxidases, como a Nox e a xantina oxidase, estão envolvidos em alterações da vasculatura pulmonar na HP, especificamente nas respostas a longo prazo à hipóxia (LIU et al., 2006).

As Nox são enzimas que catalisam a redução do oxigênio molecular a ânion superóxido e/ou peróxido de hidrogênio e podem ser ativadas por fatores de crescimento, hormônios, agonistas de receptores acoplados à proteína G, entre outros (MANEA et al., 2015), sendo que, no pulmão, foram identificadas várias isoformas da Nox. Estas isoformas, em particular a Nox2 e a Nox4, têm sido implicadas na hipertensão pulmonar induzida por hipóxia (LIU et al., 2006; MITTAL et al., 2007).

Entretanto, na HAP induzida por MCT, Veit e colaboradores (VEIT et al., 2013) evidenciaram um aumento da produção de ânion superóxido derivado da Nox1, provocando migração e proliferação de células musculares lisas arteriais pulmonares. Outro estudo demonstrou um aumento na expressão de RNAm da Nox2 e Nox4 no modelo de MCT (DORFMÜLLER et al., 2011).

No presente estudo, foi avaliada a atividade total da Nox, sem determinar a expressão das diversas isoformas. Corroborando com achados da literatura, foi observado um aumento significativo nesta atividade em resposta à MCT, sugerindo que esta pode ser uma fonte de superóxido no pulmão das fêmeas com HAP. Um estudo utilizando ratas, mas com modelo oclusivo angioproliferativo de HP, foi observado que a ativação da Nox e eNOS desacoplada contribuíram para aumentar o estresse oxidativo pulmonar dependente da sinalização de ET-1 (RAFIKOVA et al., 2013). No presente estudo, observou-se um ligeiro aumento, porém não significativo, na atividade da Nox também em função da ovariectomia. É sabido que o estrogênio pode reduzir a expressão de subunidades da Nox (PÓSA et al., 2015).

Uma vez que os dados da Nox sugerem um aumento na produção de ânion radical superóxido induzido pela MCT, foi investigada a enzima detoxificadora desta ERO, a superóxido dismutase (SOD). Esta enzima apresenta distintas isoformas e está presente em diferentes compartimentos celulares. A SOD-1 (CuZn SOD) tem uma localização citoplasmática, a SOD-2 (MnSOD) é mitocondrial e a SOD-3, que também é dependente de cobre e zinco, é extracelular (NOZIK-GRAYCK et al., 2014). A SOD tem uma importância na hiperplasia neointimal, uma vez que o aumento da expressão da SOD atenuou este processo hiperplásico (KUO et al., 2004).

Em modelos experimentais de HP, bem como em estudos com humanos, observa-se que a atividade e a expressão da SOD-3 estão diminuídas (MASRI et al., 2008). Ratos nocaute para SOD-3 têm a HP agravada, enquanto o aumento da expressão e da atividade desta enzima no pulmão protege contra a elevação da pressão arterial pulmonar e remodelamento vascular (XU et al., 2011). No presente experimento, verificou-se que a expressão da SOD-1 não foi alterada; no entanto, a atividade da SOD total no pulmão mostrou-se aumentada em função da MCT e este efeito foi potencializado nas fêmeas ovariectomizadas. Este resultado sugere que o aumento desta atividade enzimática esteja relacionado a maiores concentrações do substrato desta enzima, o ânion superóxido, tanto em resposta à doença quanto à retirada dos hormônios ovarianos. No entanto, o estudo de Bal e colaboradores (BAL et al., 2013) verificou uma diminuição na atividade da SOD, em pulmão de ratas, após administração de monocrotalina. Já em ratos machos, este mesmo estudo demonstrou aumento na atividade da SOD com a droga, enquanto que o estudo de (LUDKE et al., 2010) não mostrou diferença nesta atividade, também em ratos machos. Estes achados demonstram haver controvérsia na literatura quanto a este parâmetro, sugerindo a necessidade de mais estudos neste tema.

Outra fonte relevante de ânion radical superóxido, na vasculatura pulmonar, gerando estresse oxidativo, é proveniente do desacoplamento da eNOS (FARROW et al., 2008). O NO é sintetizado no endotélio vascular pulmonar em resposta a uma série de estímulos. Difunde-se rapidamente através das membranas celulares até o citoplasma das células musculares lisas vasculares adjacentes, onde se liga à guanilato ciclase solúvel e aumenta os níveis intracelulares de GMPc. Este fosforila a proteína cinase dependente de GMPc, diminuindo a concentração de cálcio intracelular e reduzindo, assim, o tônus vascular (KLINGER, 2007).

Em células de mamíferos, o NO é produzido por reações que transferem elétrons do oxigênio molecular através de alguns cofatores, como NADPH, 6(R)-5,6,7,8-tetra-hidrobiopterina (BH4), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) e calmodulina, gerando NO e água, durante a conversão de L-arginina em L-citrulina. Estes passos são catalisados por uma família de enzimas chamadas óxido nítrico sintases (NOS). Três isoformas da NOS foram identificadas. A NOS-I referida como neuronal ou nNOS e a NOS-III mencionada como endotelial ou eNOS, ambas constitutivamente expressas e encontradas, sobretudo, em células endoteliais vasculares e neuronais. A isoforma NOS-II ou induzível (iNOS) é rapidamente regulada para cima em resposta à inflamação (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). Estudos de HP em humanos mostram aumento da NOS desacoplada, a qual direciona para a formação de superóxido (MASON et al., 1998).

A eNOS desacoplada, como mencionado acima, pode ser uma fonte de superóxido, e assim, causar disfunção endotelial. Esta enzima necessita de vários cofatores, principalmente o BH4, para seu funcionamento, assim como níveis adequados do substrato L-arginina. A diminuição de BH4 ou excesso da sua forma oxidada (BH2) (baixos índices de BH4/BH2) determinam o desacoplamento da NOS e o oxigênio é reduzido à ânion radical superóxido. EROs geradas a partir das Noxs ou xantina oxidase podem diminuir a razão BH4/BH2 (ALP; CHANNON, 2003).

No presente estudo, foi observado um aumento na atividade da NOS em resposta à MCT, sendo que esta resposta foi dependente da ovariectomia. Associado a isto, observou-se aumentada atividade da SOD no grupo OM, reforçando a hipótese de que possa estar ocorrendo o desacoplamento da NOS, reduzindo a biodisponibilidade de NO. Já está bem estabelecido na literatura que o estrogênio regula o tônus vascular, através da modulação da expressão de NOS e, portanto,

determina as concentrações de NO (MURPHY, 2011). Desta forma, seria esperado que a atividade da NOS nas fêmeas ovariectomizadas estivesse diminuída. No entanto, sabe-se da literatura que a ovariectomia promove diminuição nos níveis de BH4, conduzindo ao desacoplamento da NOS, resultando na diminuição da produção de NO e aumento da geração de EROs (LAM et al., 2006). Deste modo, no grupo ovariectomizado que recebeu MCT, a aumentada atividade da NOS pode estar relacionada a sua forma desacoplada, o que representaria menor produção de NO.

Além disso, neste estudo foi observada redução nos níveis de nitritos causada pela MCT. As concentrações de nitritos refletem o metabolismo do NO, podendo ser consideradas como marcadores indiretos desta espécie de nitrogênio (RASSAF et al., 2002), corroborando com a ideia de que haja menos NO nos animais com HAP.

Uma vez que foi observado aumento na atividade da SOD em função da MCT, e como mencionado, esta molécula dismuta o ânion radical superóxido para formar peróxido de hidrogênio, buscou-se explorar a concentração desta EROs no pulmão, assim como de duas enzimas envolvidas no seu metabolismo, a catalase e a peroxirredoxina. Não foram observadas diferenças significativas nestes parâmetros. A aumentada atividade da SOD, levaria a um aumento nas concentrações de peróxido de hidrogênio, e conseqüentemente de suas enzimas detoxificadoras, o que não foi observado neste estudo. É possível que outras peroxidases, não avaliadas neste trabalho, possam ter contribuído para a manutenção dos níveis desta ERO. Como exemplo, poderia haver uma indução da mieloperoxidase, pelo processo inflamatório gerado pela MCT, como verificado em estudo anterior não publicado de nosso grupo (LEICHSENRING-SILVA et al., 2011).

O fato de não haver alteração dos níveis de peróxido de hidrogênio em função da doença, concorda com o resultado da avaliação da lipoperoxidação por TBARS, a qual também não se mostrou alterada com a MCT. Sabe-se que a iniciação da lipoperoxidação está relacionada à produção de radical hidroxil e que esta depende de aumentadas concentrações de peróxido de hidrogênio, em presença de metais de transição (reação de Fenton), podendo ou não depender de ânion superóxido (reação de Haber-Weiss) (LUSHCHAK, 2014).

Contudo, resultado anterior de nosso grupo de pesquisa revelou aumento de lipoperoxidação em pulmão de ratos machos tratados com MCT (LUDKE et al., 2010), apontando para uma diferença de gênero neste parâmetro. No presente experimento, foi observado aumento da lipoperoxidação no pulmão das ratas ovariectomizadas, sendo este efeito potencializado nos animais que também receberam a droga, sugerindo um papel protetor dos hormônios ovarianos. Na literatura, está bem definido que o estrogênio apresenta efeito antioxidante, podendo proteger contra a oxidação de lipídios (MENDELSON; KARAS, 1999).

O efeito dos hormônios sexuais no tecido pulmonar é complexo e não entendido completamente. O pulmão expressa ambos receptores nucleares de estrogênio, ER- α e ER- β , nas células endoteliais da artéria pulmonar, células do músculo liso, células alveolares e macrófagos alveolares. Vários estudos sugerem a expressão mais abundante do ER- β sobre ER- α no pulmão, (HAMIDI et al., 2011), enquanto outros sugerem um papel predominante do ER- α (VEGETO et al., 2010).

No entanto, neste trabalho, a expressão dos receptores ER- α e ER- β não foi alterada nem pela doença nem pela cirurgia. Sugere-se que os efeitos relacionados à ovariectomia e à MCT possam ser mediados por outros receptores ou de forma

independente dos mesmos, através de diferentes metabólitos do estradiol. Desse modo, é possível que a predominância de um receptor sobre o outro seja dependente do contexto clínico. Fatores como sexo, idade, estado hormonal e presença de doença também desempenham um papel significativo (KUMAR et al., 2010).

Outros efeitos relacionados à ovariectomia, observados neste estudo, foram o espessamento das paredes alveolares e o aumento do infiltrado inflamatório, avaliados pela análise histológica do pulmão. Em camundongos fêmeas ovariectomizadas, a resposta inflamatória pulmonar induzida por lipopolissacarídeo foi notavelmente mais intensa comparada a seu controle, como evidenciado pelo acúmulo de neutrófilos alveolares e deposição de fibrina (SPEYER et al., 2005).

Em outro modelo de dano pulmonar induzido por bleomicina, a resposta inflamatória desencadeada foi exacerbada pela ovariectomia, aumentando a fibrose e a mortalidade dos animais. O tratamento com metoxiestradiol atenuou estes efeitos (TOFOVIC et al., 2009).

Tal como esperado, no presente estudo, a MCT também induziu uma resposta inflamatória significativa no pulmão. Os mediadores da inflamação podem causar vasoconstrição e contribuir para o remodelamento vascular. De fato, foi observado, em ambos os grupos com MCT, um aumento não apenas da parede alveolar e do infiltrado inflamatório, como também da espessura da parede arteriolar. Estes achados corroboram com estudos da literatura que demonstram que a MCT induz proliferação da camada média das arteríolas pulmonares, aumentando a resistência pulmonar. A muscularização de arteríolas, levando ao espessamento da camada média é detectável 7 dias após a injeção da MCT e atinge significância 14 dias depois (MEYRICK; REID, 1979). Também foi observado que, quando foram somados os dois

fatores, ovariectomia e MCT, além do mencionado acima, houve maior deposição de fibras de colágeno perivascular. Sugere-se que, neste grupo, tenha ocorrido um remodelamento mais severo, corroborando com o observado pela medida bioquímica de dano oxidativo a lipídios.

Uma vez que a MCT se mostrou associada com aumento de células inflamatórias no pulmão, foi investigada a via TLR4/MyD88/NFκB neste modelo. O TLR4 tem sido demonstrado ser um receptor-chave na transdução de sinais pró-inflamatórios no desenvolvimento de lesão pulmonar induzida por EROs (LORNE; DUPONT; ABRAHAM, 2010). Observou-se que, em ambos grupos tratados com MCT, a expressão do TLR4 mostrou-se reduzida, sendo que o MyD88 não se alterou. Com relação ao NFκB, tanto a MCT quanto a ovariectomia reduziram sua expressão. É possível que a sinalização para o processo inflamatório tenha ocorrido em tempos mais precoces, como já demonstrado na literatura. Em modelo de HP por MCT, demonstrou-se uma resposta inflamatória intrapulmonar rápida, com aumentos relevantes de monócitos inflamatórios na adventícia de arteríolas pulmonares dentro de 8-16 horas após a injeção de MCT (WILSON et al., 1989). No presente estudo, foi avaliada uma fase crônica da doença, onde se mostra um remodelamento do parênquima pulmonar que já apresenta deposição colágeno.

Em suma, os achados do experimento I são condizentes com o modelo de HAP induzido por MCT, uma vez que foi caracterizado o remodelamento pulmonar, pelo processo inflamatório, pela deposição de colágeno e pelo aumento de EROs, o qual foi acentuado no grupo onde a doença foi associada à retirada dos hormônios ovarianos. Este remodelamento pulmonar causa um impacto sobre a estrutura e a função do ventrículo direito. Desta forma, o experimento II buscou analisar o perfil de estresse oxidativo nesta câmara cardíaca e alterações morfométricas, hemodinâmicas

e ecocardiográficas, assim como o efeito da retirada dos hormônios ovarianos sobre estes parâmetros.

É importante destacar que a função e a adaptação do ventrículo direito, frente ao remodelamento pulmonar, são os principais determinantes da capacidade funcional e sobrevida de pacientes com HAP (RYAN; ARCHER, 2014). Neste estudo, foi realizado o cateterismo cardíaco, que é considerado padrão-ouro para a confirmação do diagnóstico de HAP em pacientes (BARST et al., 2004). Foram medidas as pressões intraventriculares direitas, sendo que a pressão sistólica foi aumentada, sem elevação da pressão diastólica, nos grupos com MCT. Este resultado foi acompanhado por um incremento na pressão média na artéria pulmonar, que se mostrou levemente aumentada em ambos grupos tratados com MCT. Estudo prévio do nosso grupo, utilizando ratos machos com MCT, utilizando mesma dose e tempo, verificou um aumento de aproximadamente três vezes na pressão média na artéria pulmonar (COLOMBO et al., 2015). Ainda, neste mesmo modelo, foi observado aumento significativo na pressão diastólica final do VD (COLOMBO et al., 2013; LUDKE et al., 2010), evidenciando uma piora da função ventricular de ratos machos em relação às fêmeas.

Acompanhando estas análises, foi realizada a ecocardiografia transtorácica, para verificar se existia um aumento de resistência vascular pulmonar, que é característico da doença. Foi examinado o fluxo sanguíneo através da artéria pulmonar, observando-se a relação entre o tempo de aceleração (TAC) e o tempo de ejeção (TEJ). Em ratos machos com MCT, foi relatada uma significativa diminuição na relação TAC/TEJ, indicando aumento da resistência vascular pulmonar (LEICHSENRING-SILVA et al., 2011). Em resposta a este aumento de pós-carga ao VD, desenvolve-se hipertrofia desta câmara, a fim de manter a função de bomba

cardíaca (VONK NOORDEGRAAF; GALIÈ, 2011). No entanto, estas respostas não foram evidenciadas no presente estudo, assim como não se mostraram alterações no volume sistólico e débito cardíaco do VD. O leve aumento da pressão arterial pulmonar parece não ter sido capaz de induzir a hipertrofia ventricular direita nas fêmeas. Estes achados em conjunto, demonstram haver uma nítida diferença de gênero no desenvolvimento deste modelo experimental. De fato, há outros relatos na literatura demonstrando que fêmeas desenvolvem menos HAP, em resposta à MCT, quando comparadas aos machos (BAL et al., 2013).

No presente estudo, foi realizada a ovariectomia bilateral, cuja eficácia foi comprovada pela redução da massa uterina. No entanto, a retirada dos hormônios ovarianos parece não ter potencializado as alterações hemodinâmicas e ecocardiográficas induzidas pela MCT. Estas respostas funcionais vão ao encontro dos resultados bioquímicos, os quais não evidenciam dano oxidativo no VD, observado pela ausência de lipoperoxidação e dano à proteína. No entanto, mostrou-se um aumento de EROs gerado pela MCT neste tecido, apesar de haver uma resposta compensatória dos sistemas de defesa antioxidantes. Estudo realizado em ratos machos tratados com MCT demonstram existir aumento do dano oxidativo cardíaco, sem indução das defesas antioxidantes enzimáticas (PICHARDO et al., 1999).

A atividade da NOS se mostrou reduzida tanto em função da ovariectomia quanto da droga (grupos SM, O e OM). No entanto, nos grupos que receberam MCT (SM e OM), a redução na atividade da NOS foi acompanhada por um aumento na concentração de peróxido de hidrogênio, assim como da atividade da SOD, efeito não observado no grupo O. Esta redução de NOS associada ao incremento de EROs no VD pode estar relacionada com o aumento da pressão média na artéria pulmonar,

avaliada a partir do cateterismo cardíaco, em ambos grupos tratados com MCT. No entanto, também foi observada uma resposta compensatória das defesas antioxidantes primárias: a atividade da SOD, CAT e GPx estava aumentada em ambos grupos que receberam MCT. Esta compensação pode estar contribuindo para o fato de não haver um aumento muito acentuado na pressão pulmonar. De acordo com a hipótese deste estudo, seria esperado uma elevação adicional da pressão na artéria pulmonar no grupo onde foram somados a doença e a ovariectomia (OM). No entanto, este efeito não foi observado. Também não se observaram diferenças entre os grupos tratados com MCT (SM versus OM), com relação à adaptação das defesas enzimáticas clássicas. Portanto, buscou-se explorar outros sistemas de defesa antioxidante que pudessem estar alterados no grupo OM, de modo a explicar a este achado.

Outros sistemas responsáveis pela resposta adaptativa ao estresse oxidativo dependem do fator Nrf2/Keap1, que provavelmente seja ativado quando se têm baixas concentrações de EROs. Em resposta ao aumento destas espécies, o Nrf2 é translocado para o núcleo e interage com o elemento de resposta a antioxidantes (ARE), regulando positivamente genes que codificam antioxidantes como peroxidases, SOD, catalase, HO-1, entre outros (LUSHCHAK; EARLEY; RESTA, 2014). Neste estudo, foi observada uma diminuição do imunocontéudo do Nrf2 nos grupos ovariectomizados (O e OM). Este resultado apoia o estudo de Yu e colaboradores (YU et al., 2012), o qual demonstra que o pré-tratamento com estrogênio em células ventriculares ativa a translocação do Nrf2 para o núcleo, sugerindo um possível mecanismo para o efeito antioxidante do estrogênio.

Quando analisada a expressão da peroxiredoxina, uma proteína antioxidante regulada pelo Nrf2, esta se mostrou diminuída nos grupos ovariectomizados (O e OM).

Sabe-se que o estrogênio atua na translocação do Nrf2, e este na transcrição da peroxiredoxina (SEIBOLD et al., 2013). Contudo, a carência de dados na literatura torna difícil assegurar o papel e a associação do estrogênio com a expressão da peroxiredoxina. Semelhante resposta, foi encontrada na expressão da SOD-1, a qual também foi influenciada pela ovariectomia e consequente redução do Nrf2. Já na expressão da glutarredoxina, catalase e GPx não foram observadas diferenças significativas.

Na sequência do estudo, foi verificada a expressão da HO-1, que mostrou uma diminuição em função da MCT. Esta enzima desempenha um papel importante na metabolização do grupo heme, dando origem à biliverdina, ferro e monóxido de carbono. A biliverdina pode ser reduzida, por ação da enzima biliverdina redutase, à bilirrubina, que é um antioxidante, diminuindo a formação de radical hidroxil (GOZZELINO; JENEY; SOARES, 2010). O estudo de Yet e colaboradores (YET et al., 1999) sugere que, na ausência de HO-1 (camundongos nulos para HO-1), os cardiomiócitos manifestam uma resposta mal-adaptativa à hipóxia e subsequente desenvolvimento de HP. Estes dados foram corroborados por outro estudo que observou a diminuição da expressão da HO-1 e ativação local de processos inflamatórios associados ao remodelamento vascular e do VD na HAP (BELHAJ et al., 2013). Além disso, o presente estudo também mostrou uma interação dos fatores (MCT e cirurgia) na expressão da HO-1. No grupo OM, a expressão da HO-1 foi maior quando comparada ao grupo SM. Parece que essa adaptação é importante para evitar um prejuízo adicional da HAP na ausência de estrogênio (grupo OM). Em princípio, a expressão da HO-1 pode ser modulada pelo Nrf2. Porém, camundongos nocaute para Nrf2 não alteraram a expressão desta enzima (GOZZELINO; JENEY; SOARES, 2010). Outros fatores de transcrição, que estão envolvidos na regulação da expressão

de HO-1, tais como NFkB e AP-1, [39], poderiam ser responsáveis pelos resultados observados.

Quando analisada a expressão da Trx1, foi verificado o mesmo perfil da HO-1: diminuição nos grupos com MCT e interação entre os fatores, com aumento no grupo OM. Esta enzima, que é ubiquamente expressa nas células, contribui para a manutenção do equilíbrio redox intracelular pela sua capacidade em reduzir grupos tiol oxidados (SHAO et al., 2012). Além disso, a tioredoxina também atua como molécula intermediária na sinalização intracelular por detectar desequilíbrios do estado redox. É possível que a MCT interfira na expressão da Trx-1 em fêmeas e que o estrogênio tenha um papel importante neste processo. O estrogênio tem demonstrado ser protetor contra a insuficiência cardíaca congestiva e a apoptose induzida por angiotensina II por aumentar os níveis de Trx1 (EBRAHIMIAN et al., 2007). Também foi demonstrado que o estrogênio regula para cima a expressão de Trx1 em células endoteliais vasculares (EJIMA et al., 1999).

Este estudo também avaliou a expressão dos receptores nucleares de estrogênio, visto que há uma diferença de gênero nesta doença e, pode ser através destes receptores que o hormônio exerça seus efeitos protetores no coração. Foi observado que ambos os receptores ER- α e ER- β foram aumentados nos animais que receberam a MCT. Além disso, o ER- β apresentou um acréscimo no grupo com MCT mais ovariectomia (OM). Parece que o receptor predominante no miocárdio é o ER- β ; no entanto, há muitas divergências neste assunto (NUEDLING et al., 1999). Em ratos com HAP por MCT, o tratamento com um agonista do ER- β conseguiu reverter a congestão e fibrose pulmonar, bem como melhorar a neoangiogênese e a inflamação (UMAR et al., 2011). Na mesma linha, um fitoestrogênio, a genisteína, mostrou eficácia em reverter a HAP, parecendo ser através do ER- β (MATORI et al., 2012).

Estes dados da literatura apontam para uma cardioproteção associada ao ER- β , corroborando os achados deste trabalho, onde não se observou uma exacerbação da HAP no grupo OM, como seria esperado. Esta resposta pode estar associada com a aumentada expressão da HO-1 e da Trx1 observada no grupo OM.

Na mesma linha, a MCT, ao ativar o receptor ER- α , determinou uma redução no imunoconteúdo de HO-1 e Trx-1, o que seria deletério para o VD. A literatura sugere que existe uma possível associação entre o gene ESR1 (que codifica o receptor ER- α) e o desenvolvimento da HAP em humanos (RAJKUMAR et al., 2010). Contudo, em modelos animais, parece não haver consenso em relação da participação destes receptores em respostas benéficas ou adversas no desenvolvimento da HAP.

7 CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que, no pulmão, a retirada dos hormônios ovarianos produziu um aumento do estresse oxidativo induzido pela MCT, uma vez que foi verificada elevação do dano oxidativo e aumentada produção de radical superóxido (inferida pelo desacoplamento da NOS e pelo acréscimo na atividade da SOD). Através da análise histológica do tecido pulmonar, foi evidenciado que a associação entre MCT e ovariectomia determinou um remodelamento mais proeminente neste grupo, observado pelo aumento de infiltrado inflamatório e deposição de colágeno perivascular. Entretanto, quando analisado o ventrículo direito, a retirada dos hormônios ovarianos não produziu um aumento do estresse oxidativo induzido pela MCT no ventrículo direito. Esta resposta coincide com o fato de não haver um aumento adicional da resistência vascular pulmonar e consequente alteração da função ventricular direita. Sugere-se que a adaptação das defesas antioxidantes não-clássicas (HO-1 e Trx-1) possa estar contribuindo para esta preservação funcional através do ER- β . Em resumo, a MCT produziu um dano oxidativo pulmonar que, contudo, não repercutiu significativamente no ventrículo direito, sugerindo que estas ratas estão protegidas contra o estresse oxidativo, mesmo após a ovariectomia. No entanto, novas investigações são necessárias para entender os mecanismos subjacentes à interação do estresse oxidativo e ovariectomia na patogênese da HAP.

8 REFERENCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121–6, jan. 1984.
- AHN, B. H. et al. Estrogen and enalapril attenuate the development of right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline in ovariectomized rats. **Journal of Korean medical science**, v. 18, n. 5, p. 641–8, out. 2003.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical journal**, v. 357, n. Pt 3, p. 593–615, 1 ago. 2001.
- ALEXAKI, V.-I. et al. Activation of membrane estrogen receptors induce pro-survival kinases. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 98, n. 2-3, p. 97–110, fev. 2006.
- ALP, N. J.; CHANNON, K. M. Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Tetrahydrobiopterin in Vascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 3, p. 413–420, 4 dez. 2003.
- ALVES, J. L. et al. Pulmonary arterial hypertension in the southern hemisphere: results from a registry of incident Brazilian cases. **Chest**, v. 147, n. 2, p. 495–501, fev. 2015.
- ARAUJO, A. S. R. et al. Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 249, n. 1-2, p. 133–9, 25 abr. 2006.
- AUSTIN, E. D. et al. Gender, sex hormones and pulmonary hypertension. **Pulmonary circulation**, v. 3, n. 2, p. 294–314, abr. 2013.
- BADESCH, D. B. et al. Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry. **Chest**, v. 137, n. 2, p. 376–87, fev. 2010.
- BAL, E. et al. The effects of gender difference on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **Human & experimental toxicology**, v. 32, n. 7, p. 766–74, jul. 2013.
- BARST, R. J. et al. Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 43, n. 12 Suppl S, p. 40S–47S, 16 jun. 2004.
- BELHAJ, A. et al. Heme Oxygenase-1 and Inflammation in Experimental Right Ventricular Failure on Prolonged Overcirculation-Induced Pulmonary Hypertension. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69470, 25 jul. 2013.
- BOGAARD, H. J. et al. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. **Chest**, v. 135, n. 3, p. 794–804, mar. 2009.

BURGOYNE, J. R. et al. Hydrogen peroxide sensing and signaling by protein kinases in the cardiovascular system. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 9, p. 1042–52, 20 mar. 2013.

CAMPBELL, S. E.; FEBBRAIO, M. A. Effect of the ovarian hormones on GLUT4 expression and contraction-stimulated glucose uptake. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 282, n. 5, p. E1139–46, maio 2002.

CHAN, S. Y.; LOSCALZO, J. Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 44, n. 1, p. 14–30, jan. 2008.

CHAOUAT, A.; NAEIJE, R.; WEITZENBLUM, E. Pulmonary hypertension in COPD. **The European respiratory journal**, v. 32, n. 5, p. 1371–85, nov. 2008.

CHEEKE, P. R. Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. **Journal of animal science**, v. 66, n. 9, p. 2343–50, set. 1988.

CHIN, K. M.; RUBIN, L. J. Pulmonary arterial hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 51, n. 16, p. 1527–38, 22 abr. 2008.

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

COLOMBO, R. et al. Aerobic exercise promotes a decrease in right ventricle apoptotic proteins in experimental Cor pulmonale. **Journal of cardiovascular pharmacology**, 25 abr. 2015.

CRAIGE, S. M.; KANT, S.; KEANEY, J. F. Reactive oxygen species in endothelial function - from disease to adaptation. **Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society**, v. 79, n. 6, p. 1145–55, 25 maio 2015.

DAI, D.-F. et al. Mitochondrial proteome remodelling in pressure overload-induced heart failure: the role of mitochondrial oxidative stress. **Cardiovascular research**, v. 93, n. 1, p. 79–88, 1 jan. 2012.

DEMARCO, V. G. et al. Oxidative stress contributes to pulmonary hypertension in the transgenic (mRen2)²⁷ rat. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 294, n. 6, p. H2659–68, jun. 2008.

DORFMÜLLER, P. et al. Increased oxidative stress and severe arterial remodeling induced by permanent high-flow challenge in experimental pulmonary hypertension. **Respiratory research**, v. 12, p. 119, jan. 2011.

EARLEY, S.; RESTA, T. C. Estradiol attenuates hypoxia-induced pulmonary endothelin-1 gene expression. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 283, n. 1, p. L86–93, 1 jul. 2002.

EBRAHIMIAN, T. et al. Differential regulation of thioredoxin and NAD(P)H oxidase by angiotensin II in male and female mice. **Journal of hypertension**, v. 25, n. 6, p. 1263–71, jun. 2007.

EJIMA, K. et al. 17beta-estradiol induces protein thiol/disulfide oxidoreductases and protects cultured bovine aortic endothelial cells from oxidative stress. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 140, n. 6, p. 608–13, jun. 1999.

FARACI, F. M.; DIDION, S. P. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 24, n. 8, p. 1367–73, ago. 2004.

FARHAT, M. Y. et al. Protection by oestradiol against the development of cardiovascular changes associated with monocrotaline pulmonary hypertension in rats. **British journal of pharmacology**, v. 110, n. 2, p. 719–23, out. 1993.

FARROW, K. N. et al. Superoxide dismutase restores eNOS expression and function in resistance pulmonary arteries from neonatal lambs with persistent pulmonary hypertension. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 295, n. 6, p. L979–87, dez. 2008.

FLIEGNER, D. et al. Female sex and estrogen receptor-beta attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 298, n. 6, p. R1597–606, 1 jun. 2010.

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

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European heart journal**, v. 33, n. 7, p. 829–37, 837a–837d, abr. 2012.

FREEMAN, M. E. Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. In: NEILL, J. D. et al. (Eds.). . **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. [s.l.] Elsevier, 2006. v. 2p. 2327–2388.

GOMEZ-ARROYO, J. et al. Metabolic gene remodeling and mitochondrial dysfunction in failing right ventricular hypertrophy secondary to pulmonary arterial hypertension. **Circulation. Heart failure**, v. 6, n. 1, p. 136–44, jan. 2013.

GONZALES, R. J.; WALKER, B. R.; KANAGY, N. L. 17{beta}-Estradiol increases nitric oxide-dependent dilation in rat pulmonary arteries and thoracic aorta. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 280, n. 3, p. L555–564, 1 mar. 2001.

GONZALEZ, F. J. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. **Mutation research**, v. 569, n. 1-2, p. 101–10, 6 jan. 2005.

GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free radical biology & medicine**, v. 10, n. 2, p. 93–100, jan. 1991.

GOZZELINO, R.; JENEY, V.; SOARES, M. P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 50, p. 323–54, jan. 2010.

GRANGER, D. L. et al. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. **Methods in enzymology**, v. 301, p. 49–61, jan. 1999.

GRUBER, C. J. et al. Production and actions of estrogens. **The New England journal of medicine**, v. 346, n. 5, p. 340–52, 31 jan. 2002.

GRUBER, D. M.; HUBER, J. C. Tissue specificity: the clinical importance of steroid metabolites in hormone replacement therapy. **Maturitas**, v. 37, n. 3, p. 151–7, 31 jan. 2001.

GRUBER, J.; SCHAFFER, S.; HALLIWELL, B. The mitochondrial free radical theory of ageing--where do we stand? **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 13, p. 6554–79, jan. 2008.

GUPTA, A. A.; POWNALL, H. J.; HAMILTON, D. J. Estrogen: An Emerging Regulator of Insulin Action and Mitochondrial Function. **Journal of diabetes research**, v. 2015, p. 916585, jan. .

HALLIWELL, B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. **British journal of experimental pathology**, v. 70, n. 6, p. 737–57, dez. 1989.

HAMIDI, S. A. et al. 17 β -estradiol protects the lung against acute injury: possible mediation by vasoactive intestinal polypeptide. **Endocrinology**, v. 152, n. 12, p. 4729–37, dez. 2011.

HARADA, N. et al. Localized Expression of Aromatase in Human Vascular Tissues. **Circulation Research**, v. 84, n. 11, p. 1285–1291, 11 jun. 1999.

HASSOUN, P. M. et al. Inflammation, Growth Factors, and Pulmonary Vascular Remodeling. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, n. 1, p. S10–S19, 30 jun. 2009.

HOMMA, N. et al. Genistein, a phytoestrogen, attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Respiration; international review of thoracic diseases**, v. 73, n. 1, p. 105–12, jan. 2006.

HU, L. W. et al. Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 285, n. 6, p. R1473–80, dez. 2003.

IRANI, K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. **Circulation research**, v. 87, n. 3, p. 179–83, 4 ago. 2000.

JASMIN, J. F. et al. Effectiveness of a nonselective ET(A/B) and a selective ET(A) antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 103, n. 2, p. 314–8, 16 jan. 2001.

JONES, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 295, n. 4, p. C849–68, 1 out. 2008.

KARARIGAS, G. et al. Role of the estrogen/estrogen-receptor-beta axis in the genomic response to pressure overload-induced hypertrophy. **Physiological genomics**, v. 43, n. 8, p. 438–46, 27 abr. 2011.

KASAHARA, Y. et al. Bioactivation of monocrotaline by P-450 3A in rat liver. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 124–9, jul. 1997.

KAY, J. M.; HARRIS, P.; HEATH, D. Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. **Thorax**, v. 22, n. 2, p. 176–9, mar. 1967.

KEHRER, J. P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, n. 1, p. 43–50, 14 ago. 2000.

KLINGER, J. R. The nitric oxide/cGMP signaling pathway in pulmonary hypertension. **Clinics in chest medicine**, v. 28, n. 1, p. 143–67, ix, mar. 2007.

KNOWLTON, A. A.; LEE, A. R. Estrogen and the cardiovascular system. **Pharmacology & therapeutics**, v. 135, n. 1, p. 54–70, jul. 2012.

KOPPENOL, W. H. The centennial of the Fenton reaction. **Free radical biology & medicine**, v. 15, n. 6, p. 645–51, dez. 1993.

KUMAR, S. et al. Role of estrogen receptors in pro-oxidative and anti-oxidative actions of estrogens: a perspective. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1800, n. 10, p. 1127–35, out. 2010.

KUO, M. D. et al. Local resistance to oxidative stress by overexpression of copper-zinc superoxide dismutase limits neointimal formation after angioplasty. **Journal of endovascular therapy: an official journal of the International Society of Endovascular Specialists**, v. 11, n. 6, p. 585–94, dez. 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 15 ago. 1970.

LAHM, T. et al. 17 β -Estradiol attenuates hypoxic pulmonary hypertension via estrogen receptor-mediated effects. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 185, n. 9, p. 965–80, 1 maio 2012.

LAHM, T.; TUDER, R. M.; PETRACHE, I. Progress in solving the sex hormone paradox in pulmonary hypertension. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 307, n. 1, p. L7–26, 1 jul. 2014.

LAI, Y. L.; OLSON, J. W.; GILLESPIE, M. N. Ventilatory dysfunction precedes pulmonary vascular changes in monocrotaline-treated rats. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 70, n. 2, p. 561–6, fev. 1991.

LAM, K.-K. et al. Estrogen therapy replenishes vascular tetrahydrobiopterin and reduces oxidative stress in ovariectomized rats. **Menopause (New York, N.Y.)**, v. 13, n. 2, p. 294–302, jan. .

LEICHSENRING-SILVA, F. et al. Association of the time course of pulmonary arterial hypertension with changes in oxidative stress in the left ventricle. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 38, n. 12, p. 804–10, dez. 2011.

LING, Y. et al. Changing demographics, epidemiology, and survival of incident pulmonary arterial hypertension: results from the pulmonary hypertension registry of the United Kingdom and Ireland. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 186, n. 8, p. 790–6, 15 out. 2012.

LIU, J. Q. et al. Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox). **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 290, n. 1, p. L2–10, jan. 2006.

LLESUY, S. F. et al. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. **Tumori**, v. 71, n. 3, p. 241–9, 30 jun. 1985.

LORNE, E.; DUPONT, H.; ABRAHAM, E. Toll-like receptors 2 and 4: initiators of non-septic inflammation in critical care medicine? **Intensive care medicine**, v. 36, n. 11, p. 1826–35, nov. 2010.

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

LUDKE, A. R. L. et al. Modulation of monocrotaline-induced cor pulmonale by grape juice. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 55, n. 1, p. 89–95, jan. 2010.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, 28 dez. 2014.

LUSHCHAK, V. I.; EARLEY, S.; RESTA, T. C. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, dez. 2014.

MAARMAN, G. et al. A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? **Pulmonary circulation**, v. 3, n. 4, p. 739–56, dez. 2013.

MAIR, K. M. et al. Pulmonary arterial hypertension: basis of sex differences in incidence and treatment response. **British journal of pharmacology**, v. 171, n. 3, p. 567–79, fev. 2014.

MANDEGAR, M. et al. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. **Microvascular research**, v. 68, n. 2, p. 75–103, set. 2004.

MANEA, S.-A. et al. Regulation of Nox enzymes expression in vascular pathophysiology: Focusing on transcription factors and epigenetic mechanisms. **Redox biology**, v. 5, p. 358–366, 25 jun. 2015.

MARKLUND, S. L. Superoxide dismutase isoenzymes in tissues and plasma from New Zealand black mice, nude mice and normal BALB/c mice. **Mutation research**, v. 148, n. 1-2, p. 129–34, jan. .

MARTIN, Y. N.; PABELICK, C. M. Sex differences in the pulmonary circulation: implications for pulmonary hypertension. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 306, n. 9, p. H1253–64, maio 2014.

MASON, N. A. et al. High expression of endothelial nitric oxide synthase in plexiform lesions of pulmonary hypertension. **The Journal of pathology**, v. 185, n. 3, p. 313–8, jul. 1998.

MASRI, F. A. et al. Deficiency of lung antioxidants in idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Clinical and translational science**, v. 1, n. 2, p. 99–106, set. 2008.

MASSAFRA, C. et al. Effects of estrogens and androgens on erythrocyte antioxidant superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities during the menstrual cycle. **The Journal of endocrinology**, v. 167, n. 3, p. 447–52, dez. 2000.

MATHEW, R. et al. Role of nitric oxide and endothelin-1 in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **Cardiovascular research**, v. 30, n. 5, p. 739–46, nov. 1995.

MATORI, H. et al. Genistein, a soy phytoestrogen, reverses severe pulmonary hypertension and prevents right heart failure in rats. **Hypertension**, v. 60, n. 2, p. 425–30, ago. 2012.

MATTOCKS, A. R. et al. Metabolism and toxicity of synthetic analogues of macrocyclic diester pyrrolizidine alkaloids. **Chemico-biological interactions**, v. 58, n. 1, p. 95–108, abr. 1986.

MCGOON, M. D.; MILLER, D. P. REVEAL: a contemporary US pulmonary arterial hypertension registry. **European respiratory review: an official journal of the European Respiratory Society**, v. 21, n. 123, p. 8–18, 1 mar. 2012.

MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. **The New England journal of medicine**, v. 340, n. 23, p. 1801–11, 10 jun. 1999.

MEYRICK, B.; REID, L. Development of pulmonary arterial changes in rats fed *Crotalaria spectabilis*. **The American journal of pathology**, v. 94, n. 1, p. 37–50, jan. 1979.

MITTAL, M. et al. Hypoxia-dependent regulation of nonphagocytic NADPH oxidase subunit NOX4 in the pulmonary vasculature. **Circulation research**, v. 101, n. 3, p. 258–67, 3 ago. 2007.

MONTANI, D. et al. Pulmonary arterial hypertension. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 8, p. 97, jan. 2013.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 110, n. 1, p. 87–94, jan. 2012.

MURPHY, E. Estrogen signaling and cardiovascular disease. **Circulation research**, v. 109, n. 6, p. 687–96, 2 set. 2011.

NADADUR, R. D. et al. Reverse right ventricular structural and extracellular matrix remodeling by estrogen in severe pulmonary hypertension. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 113, n. 1, p. 149–58, jul. 2012.

NICKENIG, G. The AT1-Type Angiotensin Receptor in Oxidative Stress and Atherogenesis: Part I: Oxidative Stress and Atherogenesis. **Circulation**, v. 105, n. 3, p. 393–396, 22 jan. 2002.

NOZIK-GRAYCK, E. et al. Selective depletion of vascular EC-SOD augments chronic hypoxic pulmonary hypertension. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 307, n. 11, p. L868–76, 1 dez. 2014.

NUEDLING, S. et al. 17 Beta-estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo. **Cardiovascular research**, v. 43, n. 3, p. 666–74, 15 ago. 1999.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–8, jun. 1979.

PANTANO, C. et al. Redox-sensitive kinases of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, n. 9-10, p. 1791–806, 20 jan. 2006.

PATTEN, R. D. et al. 17 Beta-estradiol differentially affects left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy following myocardial infarction and pressure overload. **Journal of cardiac failure**, v. 14, n. 3, p. 245–53, abr. 2008.

PAYNE, A. H.; HALES, D. B. Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones. **Endocrine Reviews**, 1 jul. 2013.

PICHARDO, J. et al. Myocardial oxidative stress changes during compensated right heart failure in rats. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 196, n. 1-2, p. 51–7, jun. 1999.

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

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 55–74, 22 abr. 2015.

PITANGA, B. P. S. et al. The Role of Astrocytes in Metabolism and Neurotoxicity of the Pyrrolizidine Alkaloid Monocrotaline, the Main Toxin of *Crotalaria retusa*. **Frontiers in pharmacology**, v. 3, p. 144, jan. 2012.

PÓSA, A. et al. Endogenous Estrogen-Mediated Heme Oxygenase Regulation in Experimental Menopause. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2015, p. 429713, jan. 2015.

PRAKASH, A. S. et al. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. **Mutation research**, v. 443, n. 1-2, p. 53–67, 15 jul. 1999.

PUGH, M. E.; HEMNES, A. R. Pulmonary hypertension in women. **Expert review of cardiovascular therapy**, v. 8, n. 11, p. 1549–58, nov. 2010.

RABINOVITCH, M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 7, p. 2372–9, jul. 2008.

RAFIKOVA, O. et al. Bosentan inhibits oxidative and nitrosative stress and rescues occlusive pulmonary hypertension. **Free radical biology & medicine**, v. 56, p. 28–43, mar. 2013.

RAJKUMAR, R. et al. Genomewide RNA expression profiling in lung identifies distinct signatures in idiopathic pulmonary arterial hypertension and secondary pulmonary hypertension. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 298, n. 4, p. H1235–48, abr. 2010.

RASSAF, T. et al. Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. **The Journal of clinical investigation**, v. 109, n. 9, p. 1241–8, maio 2002.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in enzymology**, v. 233, p. 357–63, jan. 1994.

ROCHETTE, L. et al. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? **Pharmacology & therapeutics**, v. 140, n. 3, p. 239–57, dez. 2013.

RUDSKI, L. G. et al. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European

Society of Cardiology, and t. **Journal of the American Society of Echocardiography: official publication of the American Society of Echocardiography**, v. 23, n. 7, p. 685–713; quiz 786–8, jul. 2010.

RUIZ-LARREA, M. B. et al. Antioxidant action of estrogens in rat hepatocytes. **Revista española de fisiología**, v. 53, n. 2, p. 225–9, jun. 1997.

RYAN, J. J.; ARCHER, S. L. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. **Circulation research**, v. 115, n. 1, p. 176–88, 20 jun. 2014.

SANTANA, A. B. C. et al. Effect of high-fat diet upon inflammatory markers and aortic stiffening in mice. **BioMed research international**, v. 2014, p. 914102, jan. 2014.

SATHISH, V.; MARTIN, Y. N.; PRAKASH, Y. S. Sex steroid signaling: implications for lung diseases. **Pharmacology & therapeutics**, v. 150, p. 94–108, jun. 2015.

SEIBOLD, P. et al. Polymorphisms in oxidative stress-related genes and mortality in breast cancer patients--potential differential effects by radiotherapy? **Breast (Edinburgh, Scotland)**, v. 22, n. 5, p. 817–23, out. 2013.

SHAO, D. et al. Redox modification of cell signaling in the cardiovascular system. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 52, n. 3, p. 550–8, mar. 2012.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental physiology**, v. 82, n. 2, p. 291–5, mar. 1997.

SIMONNEAU, G. et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, n. 1 Suppl, p. S43–54, 30 jun. 2009.

SIMONNEAU, G. et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 25 Suppl, p. D34–41, 24 dez. 2013.

SINGAL, P. K. et al. Oxidative stress in congestive heart failure. **Current cardiology reports**, v. 2, n. 3, p. 206–11, maio 2000.

SIQUEIRA, R. et al. Influence of estrogen on pulmonary arterial hypertension: role of oxidative stress. **Cell biochemistry and function**, v. 29, n. 7, p. 543–8, out. 2011.

SKAVDAHL, M. et al. Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 288, n. 2, p. H469–76, 1 fev. 2005.

SPEYER, C. L. et al. Regulatory effects of estrogen on acute lung inflammation in mice. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 288, n. 4, p. C881–90, abr. 2005.

TABIMA, D. M.; FRIZZELL, S.; GLADWIN, M. T. Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. **Free radical biology & medicine**, v. 52, n. 9, p. 1970–86, 1 maio 2012.

THOMAS, D. D. et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. **Free radical biology & medicine**, v. 45, n. 1, p. 18–31, 1 jul. 2008.

TOFOVIC, S. P. et al. 2-methoxyestradiol attenuates bleomycin-induced pulmonary hypertension and fibrosis in estrogen-deficient rats. **Vascular pharmacology**, v. 51, n. 2-3, p. 190–7, jan.2009.

TOFOVIC, S. P. et al. Synergistic therapeutic effects of 2-methoxyestradiol with either sildenafil or bosentan on amelioration of monocrotaline-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 475–83, nov. 2010a.

TOFOVIC, S. P. Estrogens and development of pulmonary hypertension: interaction of estradiol metabolism and pulmonary vascular disease. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 696–708, dez. 2010b.

TOFOVIC, S. P.; JACKSON, E. K. Complexities of oestradiol pharmacology in pulmonary arterial hypertension. **The European respiratory journal**, v. 41, n. 6, p. 1465–6, jun. 2013.

TUDER, R. M. et al. Pathology of pulmonary hypertension. **Clinics in chest medicine**, v. 28, n. 1, p. 23–42, vii, mar. 2007.

UMAR, S. et al. Estrogen rescues preexisting severe pulmonary hypertension in rats. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 184, n. 6, p. 715–23, 15 set. 2011.

URBONIENE, D. et al. Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 299, n. 3, p. L401–12, set. 2010.

VAILLANCOURT, M. et al. Adaptation and Remodelling of the Pulmonary Circulation in Pulmonary Hypertension. **The Canadian journal of cardiology**, v. 31, n. 4, p. 407–415, abr. 2015.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, 10 mar. 2006.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, jan. 2007.

VAN EICKELS, M. et al. 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. **Circulation**, v. 104, n. 12, p. 1419–23, 18 set. 2001.

VEGETO, E. et al. Estrogen receptor-alpha as a drug target candidate for preventing lung inflammation. **Endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 174–84, jan. 2010.

VEIT, F. et al. Function of NADPH oxidase 1 in pulmonary arterial smooth muscle cells after monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 18, p. 2213–31, 20 dez. 2013.

VONK NOORDEGRAAF, A.; GALIÈ, N. The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension. **European respiratory review: an official journal of the European Respiratory Society**, v. 20, n. 122, p. 243–53, dez. 2011.

WAGNER, A. H.; SCHROETER, M. R.; HECKER, M. 17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 12, p. 2121–30, out. 2001.

WANG, Y.; CHUN, O. K.; SONG, W. O. Plasma and dietary antioxidant status as cardiovascular disease risk factors: a review of human studies. **Nutrients**, v. 5, n. 8, p. 2969–3004, ago. 2013.

WASSMANN, S. et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. **Circulation**, v. 103, n. 3, p. 435–41, 23 jan. 2001.

WEDGWOOD, S. et al. Role for endothelin-1-induced superoxide and peroxynitrite production in rebound pulmonary hypertension associated with inhaled nitric oxide therapy. **Circulation research**, v. 89, n. 4, p. 357–64, 17 ago. 2001.

WEI, Y. et al. Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 46, p. 35137–46, 17 nov. 2006.

WERCHAN, P. M. et al. Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **The American journal of physiology**, v. 256, n. 5 Pt 2, p. H1328–36, maio 1989.

WHITE, K. et al. Activity of the estrogen-metabolizing enzyme cytochrome P450 1B1 influences the development of pulmonary arterial hypertension. **Circulation**, v. 126, n. 9, p. 1087–98, 28 ago. 2012.

WILSON, D. W. et al. Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. **Microvascular research**, v. 38, n. 1, p. 57–80, jul. 1989.

XING, D. et al. Estrogen and mechanisms of vascular protection. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 29, n. 3, p. 289–95, mar. 2009.

XU, D. et al. Exacerbated pulmonary arterial hypertension and right ventricular hypertrophy in animals with loss of function of extracellular superoxide dismutase. **Hypertension**, v. 58, n. 2, p. 303–9, ago. 2011.

YAO, J. et al. Hepatic cytochrome P450s play a major role in monocrotaline-induced renal toxicity in mice. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 35, n. 2, p. 292–300, fev. 2014.

YET, S.-F. et al. Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 8, p. R23–R29, 15 abr. 1999.

YILDIZ, P. Molecular mechanisms of pulmonary hypertension. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 403, n. 1-2, p. 9–16, maio 2009.

YU, J. et al. 17β -estradiol regulates the expression of antioxidant enzymes in myocardial cells by increasing Nrf2 translocation. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 26, n. 7, p. 264–9, jul. 2012.

ANEXO I

Assunto Submission Confirmation
Remetente Life Sciences <lifesci@elsevier.com>
Para <00008617@ufrgs.br>, <belklein@ufrgs.br>
Data 2015-08-10 14:40

CHASQUE
WEBMAIL 
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dear Dr. Belló-Klein,

Your submission entitled "Effects of ovariectomy in antioxidant defense systems in right ventricle of female rats with pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline" has been received by Life Sciences

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial Systems as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/lfs/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Life Sciences

ANEXO II

Effects of ovariectomy in antioxidant defense systems in right ventricle of female rats with pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline

Rafaela Siqueira^a; Rafael Colombo^a; Adriana Conzatti^a; Alexandre Luz de Castro^a; Cristina Campos Carraro^a; Angela Maria Vicente Tavares^a; Tânia Regina Gattelli Fernandes^a; Alex Sander da Rosa Araujo^a, Adriane Belló-Klein^a

^a Laboratory of Cardiovascular Physiology and Reactive Oxygen Species, Physiology Department, Institute of Basic Health Science (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding Author: Dr. Adriane Belló-Klein belklein@ufrgs.br. Laboratory of Cardiovascular Physiology and Reactive Oxygen Species, Physiology Department, Institute of Basic Health Science (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS, Brazil. CEP 90050-170. Phone: +55 (51) 3308-3621.

Word count: 6775

Table count: 2

Figures count: 3

Abstract

It is known that there are gender differences on the development and progression of pulmonary arterial hypertension (PAH), and that oxidative stress and antioxidant defenses may be involved in this process. **Aims:** The aim of this study was to evaluate the impact of ovariectomy on oxidative stress and adaptations of antioxidant system in right ventricle (RV) of female rats with PAH induced by monocrotaline (MCT). **Main Methods:** Rats were divided in four groups: sham (S), sham + MCT (SM), ovariectomized (O), and ovariectomized + MCT (OM). MCT (60 mg/kg i.p) was injected one week after ovariectomy or sham surgery. Three weeks after injection, it was performed echocardiographic analysis and RV catheterism. RV was excised to morphometric, biochemical, and molecular analysis. **Key findings:** MCT promoted a slight increase in pulmonary artery pressure, without difference between SM and OM groups, but did not induce RV hypertrophy. Hydrogen peroxide increased in MCT groups, but antioxidant enzyme activities of SOD, CAT, and GPx were also enhanced. Non-classical antioxidant defenses diminished in ovariectomized groups, probably as a consequence of Nrf2 decrease. Thioredoxin-1 and hemeoxygenase-1 expression was increased in OM group, as compared to SM. This effect was accompanied by a significant elevation in the estrogen receptor β (ER- β) immunocontent. **Significance:** It seems that thioredoxin-1 and hemeoxygenase-1 are crucial to avoid additional increments in oxidative stress in the OM group and an impairment in PAH and RV remodeling.

Key words: Oxidative stress, estrogen, hemeoxygenase, thioredoxin, pulmonary hypertension

Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a devastating disease, characterized by an increase in mean pulmonary artery pressure [1]. The main changes in the PAH are vascular inflammation, tunica media hypertrophy of pulmonary vessels and an imbalance between excessive vasoconstrictors and lack of vasodilators [2, 3]. These factors together contribute to an increased pulmonary vascular resistance and may cause an increment in afterload imposed to right ventricle (RV) [4]. This increased afterload promotes adaptations in RV, ranging from RV hypertrophy to right ventricular failure and premature death. It is known that the prevalence of this disease is higher in women than in men [5]. Although there is an impact of gender in this pathophysiology, the mechanisms involved are still not well understood [6]. Even though women are more affected by PAH, survival after diagnosis is higher in women than in men. One of the mechanisms proposed to this outcome is RV adaptations to this insult [7].

It is believed that one of the most important differences observed between male and female is the protective effect of estrogen in animal models of PAH [8]. However, there are contradictory influences of this hormone in pulmonary and cardiac vasculature due to different estrogen metabolites [6]. Most part of the biological estrogen effects on cells occurs through estrogen receptors α (ER- α) and β (ER- β), both expressed in cardiovascular system [9]. Several factors can regulate these receptors expression, activity and biological effects. Among the circumstances that can make an ER to preponderate over another are gender, age, hormone levels and diseases [6]. Besides that, estrogen effects can also be mediated through an ERs independent pathway [10].

Estrogen administration has been associated with an improvement in the PAH in animal models of hypoxia and monocrotaline [11, 12]. This cardioprotective effect may result of the direct effect of estrogen as a free radicals scavenger [13]. This hormone may also play an antioxidant role since it increases gene expression of antioxidant proteins such as heme oxygenase, superoxide dismutase, and thioredoxin [14]. It has been reported that this estrogen genomic effect can be determined by the activation of the nuclear factor-erythroid 2 - related factor 2 (Nrf2), even though the mechanism by which this occurs remains to be further investigated [15]. There is an association between lack of estrogen and antioxidant defense system impairment [16]. After menopause, the production of reactive oxygen species (ROS) increases, leading to oxidative stress. Oxidative stress is involved with PAH [17], since ROS can modulate vascular tone, smooth muscle cell proliferation, vascular remodeling and apoptosis. ROS levels are directly associated to the progression from RV hypertrophy to heart failure [18]. Besides there is some information about the influence of estrogen on PAH female rats, oxidative stress in RV was not explored in this experimental model. Therefore, this study aims to evaluate the impact of ovariectomy in oxidative

stress and adaptations of antioxidant system in RV of female rats with PAH and its association with elevation in pulmonary vascular resistance and consequent RV remodeling.

Materials and Methods

Ethical approval

All animal procedures used in this study were in accordance with institutional guidelines and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 86-23) and were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Rio Grande do Sul (project number 21372).

Animals and treatments

Female Wistar rats, weighing 180 ± 50 g, were obtained from the Center of Reproduction and Experimentation of Laboratory Animals (CREAL) of the Federal University of Rio Grande do Sul. The rats were housed in plastic cages, four animals in each cage, and received water and food ad libitum. They were maintained under temperature, humidity and light/dark cycles of 12 hours standard conditions. Four experimental groups (n=6) were established by random distribution of animals: a) sham (S): submitted to ovariectomy simulation surgery, b) sham + monocrotaline (SM): submitted to ovariectomy simulation surgery and monocrotaline injection, c) ovariectomized (O): submitted to bilateral ovariectomy and d) ovariectomized + monocrotaline (OM): submitted to ovariectomy and monocrotaline injection. Induction of PAH occurred one week after ovariectomy or sham surgery, with a single intraperitoneal injection (60 mg.kg^{-1}) of monocrotaline (Sigma Chemicals, St Louis, MO) or the same volume of saline [19]. The overall duration of the protocol was 3 weeks. At the end of the protocol, the animals were anesthetized with ketamine (90 mg.kg^{-1} i.p.) and xylazine (10 mg.kg^{-1} i.p.) and killed afterward by cervical dislocation.

Bilateral ovariectomy

Rats were anesthetized with ketamine (90 mg / kg i.p.) and xylazine (10 mg / kg i.p.) to perform bilateral ovariectomy. An incision was made in the skin and subcutaneous tissue between the ribs and iliac crest, and a

second incision in the muscle layer was until the display of the ovaries. They were exposed and removed [20]. In the S and SM groups was carried out the same procedure, without the removal of the ovaries.

Determination of the estrous cycle

Achievement of the estrous cycle was started after the end of the experimental protocol in animals that did not undergo ovariectomy. The cycle for each animal was determined by observation of the serum of vaginal smear. The slides were compared with the findings of Marcondes et al. [21]. All non-ovariectomized animals were killed during diestrus phase.

Echocardiography assessment

Echocardiographic images are obtained from two-dimensional mode and pulsed Doppler (Ultrasound System Philips HD7, Andover, MA, USA) with a linear probe L12-3 (Philips, Andover, MA, USA). It was evaluated the relationship between the acceleration time (AT) to ejection time (ET) through the pulmonary artery flow, stroke volume (SV) and cardiac output (CO) of the right ventricle. For the calculation of stroke volume the following formula was used: $VS = \text{cross-sectional area of the pulmonary artery (AST)} \times \text{full-time flow rate through the pulmonary artery (IVA)}$; Where: $AST = (\text{systolic pulmonary artery diameter} / 2)^2 \times 3.14$. To calculate cardiac output, the following formula was used: $DC = VS \times \text{heart rate (HR)}$, where: $FC = 60 / \text{RR interval measured during flow through the pulmonary artery}$ [22, 23].

Hemodynamic evaluation

For hemodynamic evaluation to right jugular vein was exposed and a polyethylene catheter (PE-50) was introduced to the atrium and right ventricle. The catheter was connected to a pressure transducer (strain-gauge transducer, Narco Biosystems RP-155, Houston, Texas, USA) and coupled to a signal amplifier (HP 8850C Pressure Amplifier), for monitoring right ventricular systolic pressure (RVSP) and end-diastolic pressure (RVEDP). Analog signals were digitalized (Windaq - Data Acquisition System, PC 486) with a sampling rate of 1000 Hz [24]. The right ventricular systolic pressure (RVSP) was used in order to estimate systolic pulmonary artery pressure. It is well known that the RVSP is similar to systolic pulmonary artery pressure. Pulmonary

artery pressure (PAP) was estimated by using the following equation: Mean PAP (mmHg) = 0.61*systolic PAP + 2 [25].

Morphometric analysis

Cardiac hypertrophy was calculated by the relationship between right ventricular mass to body weight (mg /g) and right ventricular mass to tibia length (mg / mm) [26]. Uterus was removed and its wet weight was quantified to confirm the efficacy of ovariectomy [20].

Hydrogen peroxide concentration

The assay was based on horseradish peroxidase-mediated oxidation of phenol red by hydrogen peroxide. A slice of the right ventricle was homogenized in potassium chloride (1.15% w/v) and phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF 20 mmol/L) and centrifuged (3000 rpm for 20 minutes at 0° to 4°C). The supernatant was used to further analysis. To determine the concentration of hydrogen peroxide (nmol/mg tissue), a standard curve with hydrogen peroxide concentrations of 10, 20 and 30 micromolar was performed. After hydrogen peroxide addition to the standard curve and the supernatant of the right ventricle in microplate wells, the experiment continues with incubation with a buffer containing phenol red, dextrose, and horseradish peroxidase. After incubation, NaOH 1N was added and readings were taken at 610 nm [27].

Nitric oxide synthase (NOS) activity

NOS activity in RV homogenates was evaluated by measuring the conversion of oxyhemoglobin (HbO₂) in methemoglobin NO-induced, as described by Valdez et al (2005). The reaction medium was composed by (in mmol /L): CaCl₂ 1.8; KCl 2.7; MgCl₂ 0.23; NaCl 137; NaH₂PO₄ 3.6; glucose 5.0; HEPES 10; pH 7.4, containing 2 mol /L HbO₂ and 1 mmol /L L-arginine. NOS activity was expressed in nmoles NO / min / mg protein [28].

Antioxidant enzyme activities

Antioxidant enzyme activities were determined in RV homogenates. Catalase activity was determined by following the decrease in hydrogen peroxide absorbance at 240nm. It was expressed in picomoles per milligram of protein [29]. Superoxide dismutase activity was expressed as units per milligram of protein. Absorbance changes were observed at 420nm for 2 min. This determination was based on the inhibition of superoxide radical reaction by pyrogallol [30]. Glutathione peroxidase was based on the consumption of NADPH and measured at 340 nm. Activity was reported in nanomoles per minute per milligram of protein [31].

Protein oxidation measurement

RV samples were incubated with 10 mmol/L dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2.5 mol/L HCl at room temperature for 1 h. TCA (20%) was added and precipitated proteins and pellets were washed with ethanol:ethyl acetate (1:1)(v/v). The final precipitates were dissolved in 6 mol/L guanidine hydrochloride, and read at 360nm. Results were expressed in nmol / mg protein [32]

Lipid peroxidation assay

The evaluation of lipid peroxidation was based on the method which consists in adding an synthetic organic hydroperoxide (tert -butyl hydroperoxide) to the RV homogenates to evaluate the responsiveness of the produced sample. Chemiluminescence was measured in a beta counter (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215, LKB Produkter AB, Bromma, Sweden) with the coincidence circuit disconnected, and using the tritium channel. Results were expressed in counts per seconds (cps) per mg protein [33]

Determination of Protein Concentration

Protein was measured by the method of Lowry et al. [34], using bovine serum albumin as standard. The results were expressed in mg of protein/mL.

Western blot analysis

The right ventricular tissue was homogenized and centrifuged at 8000g for 15 minutes at 4°C to remove the nuclei and cell debris. Supernatants were used for the assay. Forty-eight micrograms of protein was subjected to one-dimensional SDS-PAGE in a discontinuous system using different concentrations of separating gel and stacking gel [35]. The proteins separated were transferred electrophoretically to PVDF membranes, using a buffer (pH 8.2, Tris 25 mmol/L, glycine 192 mmol/L and SDS 0,1%) in a cooled Bio-Rad Trans-Blot unit (Bio-Rad, São Paulo, SP, Brazil). The non-specific protein-binding was blocked by 1h incubation with non-fat milk in Tris buffer. The membranes were processed for immunodetection using the following primary antibodies: rabbit anti-CAT (60 kDa), anti-SOD-1 (23 kDa), anti-GPx-1 (22 kDa), anti-HO-1 (32 kDa), anti-Prx VI (25 kDa), anti-Trx-1 (12 kDa), anti-Grx 1 (12 kDa), anti-Nrf2 (57 kDa), anti-ER- β (56 kDa) and anti-ER- α (66 kDa). Binding of primary antibodies was detected with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase, and membranes were developed using chemiluminescence. The autoradiographs generated were analyzed quantitatively with an image densitometer ImageJ (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). The molecular weights of the bands were determined by reference to a standard molecular weight marker (RPN 800 rainbow full range; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The results from each membrane were normalized by β -tubulin immunocontent.

Statistical analysis

Data were submitted to the Kolmogorov-Smirnov normality test. The results that have shown normal distribution are presented as mean \pm standard deviation. The values from each animal were subjected to the two-way analysis of variance (ANOVA) and complemented by Student-Newman-Keuls test. The outcomes without normal distribution were shown as medians and interquartile intervals. For these outcomes, we used the statistical test of multiple comparisons of Kruskal-Wallis. The software used to perform the analysis was the SigmaPlot version 11.0. An alpha error probability smaller or equal to 0.05 ($P \leq 0.05$) was considered significant.

Results

Echocardiographic, hemodynamic, and morphometric analysis

The acceleration time to eject time ratio (AT/ET) through pulmonary artery was evaluated to estimate pulmonary resistance and it is shown in Table 1. No significant change was seen in this parameter among groups. Echocardiographic images of pulmonary artery flow showed slight increase (not significant) in pulmonary resistance demonstrated by the presence of a midsystolic notch in the monocrotaline groups (shown in the arrow in Figure 1). Stroke volume (SV) and cardiac output (CO) were also determined, and no difference was noticed among groups (Table 1). Hemodynamic evaluation was performed through catheterism of RV to determine intraventricular pressures (RVSP and RVEDP). Based on RVSP, it was estimated the mean pressure in pulmonary artery (PAP). No difference was found in RVEDP among groups (Table 1). MCT induced a significant increase in the RVSP and PAP by about 40%, and this effect was independent of ovariectomy (Table 1). The right ventricular hypertrophy index did not show significant differences among groups ($P < 0.05$). The uterine atrophy induced by ovariectomy was demonstrated with a reduction of 71% and 67% in uterine weight in the O and in OM groups compared to S and SM groups, respectively (Table 1).

Biochemical analysis

Biochemical analysis performed in RV homogenates is shown in Table 2. MCT and ovariectomy were efficient in reducing the NOS activity ($P < 0.05$). This enzyme exhibited a reduction by 33% in SM group and 31% in O group, when compared to S group, without showing difference between SM and OM groups.

Concerning to antioxidant enzyme activities, SOD was increased in MCT groups (SM and OM), when compared to its controls (S and O) ($P < 0.05$). Hydrogen peroxide concentration (H_2O_2) showed a similar profile as SOD, exhibiting a significant increase in the groups treated with MCT compared to its control groups. An increase of 36% was seen in SM group as compared to S, and of 37% in OM group as compared to O. CAT activity was increased in response to MCT, by about 47% in the SM group as compared to S. GPx also increased in SM group (by 52%) when comparing with S group. Oxidative damage to proteins, verified by carbonyls technique, as well as the oxidative injury to lipids, determined by chemiluminescence technique, did not show difference among groups ($P < 0.05$).

Western Blot Analysis

The Nrf2 immunocontent on RV (Figure 2A) presented a significant decrease ($P < 0.05$) in the ovariectomized groups (O and OM) as compared to S and SM groups. Ovariectomy also induced a decrease in the peroxiredoxin (Prx-VI) expression (Figure 2B). Besides that, it was visualized a significant decrease ($P < 0.05$) in OM (by 34%) group, when comparing to SM group. SOD immunocontent was reduced in the ovariectomized groups compared to its controls (Figure 2C). In the OM group, SOD immunocontent was 46% lower than in SM group. In addition, in the SM group SOD was 29% higher than S group. CAT and GPx immunocontent did not differ among groups (data not shown). Regarding to glutaredoxin (Grx-1) expression (Figure 2D), it was not observed any difference among groups ($P < 0.05$).

HO-1 immunocontent on RV (Figure 2E) showed a reduction of 63% in the SM compared to S group. MCT was effective in reducing significantly ($P < 0.05$) the immunocontent of this enzyme. Besides that, it was observed a rise (85%) in this protein immunocontent in the OM compared to SM group. Thioredoxin (Trx-1) immunocontent (Figure 2F) had a response similar to HO-1, exhibiting a significant decrease ($P < 0.05$) in response to MCT. Trx-1 was decreased by 53% in SM group as compared to S, and it was increased by 30% in OM as compared SM.

Western Blot Analysis – ER- α and ER- β

The immunocontent of ER- α (Figure 3A) on RV was significantly increased in the MCT groups ($P < 0.05$). It was an increment of 70% in SM group when compared to S. Following the same tendency, MCT was able to increase ER- β expression (Figure 3B). However, ovariectomy has also a positive effect in its expression. In the group where both factors were summed (OM group) an increase of 67% was noticed when compared to O group.

Discussion

This study demonstrated that MCT administration to female rats increased hydrogen peroxide concentration in RV, but induced an adaptive response of the classical antioxidant enzymes, in such a way that it was not evident oxidative damage in this tissue. This could be responsible for the fact that pulmonary vascular resistance was not significantly increased and RV remodeling was not seen. Ovariectomy did not produce an additional impairment in the development of this disease by MCT, maybe because of the recruitment of other non-

classical antioxidants, such as hemoxygenase and thioredoxin. This cardioprotection could be related to the activation of the ER- β observed in the group in which both factors were associated.

In this study, it was analyzed pulmonary flow through echocardiography, in order to determine AT/ET ratio, which is an index of pulmonary vascular resistance. No difference was observed in this parameter, as well as in SV and CO. In a previous study from our group, utilizing male rats, it was noticed a reduction in AT/ET ratio, indicating increased vascular resistance [36]. In patients, diagnosis confirmation is obtained by cardiac catheterism, which is considered gold standard [37]. In the present study, PAH was evidenced through the mean pulmonary artery pressure measurement, which was increased in both groups treated with MCT. It was noticed a slight increase in pulmonary pressure in female rats, while this parameter was found to be increased by about three times in male rats [38, 39]. Thus, it is suggested that the animals in the present study are under a mild pulmonary hypertensive state. This change seems to be not enough to induce RV hypertrophy, as it was demonstrated in this study, corroborating data from a previous study from our laboratory [40]. This outcome was different from that observed in male rats, where an evident RV hypertrophy was documented [41]. These findings corroborate reports in literature showing that female rats develop less PAH in response to MCT than males [42]. Bilateral ovariectomy was performed and the effectiveness of this procedure was confirmed by an evident reduction in uterus weight in both ovariectomized groups. However, ovarian hormones withdrawal seems not to potentiate the hemodynamic changes induced by MCT. These functional responses agree with biochemical findings that did not evidenced any changes in oxidative damage in RV, as observed by lipid peroxidation and carbonyls data. A study performed in male rats using MCT demonstrated an enhancement of cardiac oxidative damage [43]. However, in the present study, it was seen an increase in hydrogen peroxide, a ROS, due to MCT administration, accompanied by a compensatory response of the classical antioxidant defense system: SOD, CAT, and GPx. Increase in SOD activity in both MCT groups suggests an enhancement in superoxide anion concentration, which is its substrate. Elevation in ROS levels was associated to a reduced NOS activity, suggesting less NO bioavailability. This effect could be related with the increment observed in mean pulmonary pressure, which was mild maybe due to the adaptation of classical antioxidant enzymes discussed above.

Since it has been described a cardioprotective effect of estrogen in many experimental studies [9, 12], it would be plausible to suppose that estrogen withdrawal could impair PAH. However, OM group was not additionally impaired. Thus, we investigated whether this cardioprotection could be mediated by the induction of other non-classical antioxidant defenses regulated by Nrf2. In our study, in RV of ovariectomized animals, it was seen a reduction in antioxidant enzymes immunocontent associated to decreased Nrf2 expression. Nrf2 is a

transcription factor that, when activated by low ROS levels, releases from the Keap1 protein and translocates to the nucleus, binding to the antioxidant response element (ARE), and acting in the transcription of many antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD), CAT, peroxiredoxin, among others [44]. Thus, in the same way as described by Yu et al. [44], one may suggest that estrogen could be associated with increased Nrf2 expression. Our data have shown that the expression of peroxiredoxin was also decreased in ovariectomized animals. This protein works with small variations of hydrogen peroxide and has an important role on the inhibition of protein oxidation involved in pathological cardiac remodeling and apoptosis [45]. The lack of data in the literature makes it hard to say that estrogen is associated with peroxiredoxin expression in this model. Nevertheless, it is known that the Nrf-2 is primarily responsible for Prx transcription [46]. Thus, knowing that estrogen acts on the Nrf2 translocation and on the expression of several antioxidant enzymes, it is suggested that it may increase the levels of peroxiredoxin and to stabilize the redox environment. Similar response was seen in relation to SOD-1 immunocontent, being affected by ovariectomy and consequent reduction of Nrf2. This enzyme plays a cytoprotective and cardioprotective role [47]. Estrogen treatment increases the expression of MnSOD in cultured primary cardiomyocytes [44]. In terms of Grx, CAT (data not showed), and GPx (data not showed) immunocontent, no significant changes were seen.

Other antioxidant defense analyzed was heme oxygenase-1 (HO-1) expression, which was decreased by MCT. HO-1 plays an important role in the metabolization of heme, yielding biliverdin, iron, and carbon monoxide. Biliverdin can be reduced to the antioxidant bilirubin by the biliverdin reductase enzyme, decreasing hydroxyl radical formation from iron of heme [48]. The study of Yet et al. [49] suggests that, in the absence of HO-1 (HO-1 null mice), cardiomyocytes have a maladaptive response to hypoxia and subsequent PAH. This data was corroborated by other study that observed that the down-regulation of HO-1 was reported to be associated with PAH and RV failure [50]. In fact, our results also show a decrease in HO-1 expression in the ovary-intact female rats with PAH (SM group). However, surprisingly, in the ovariectomized rats, HO-1 expression was not decreased. Although the reason for these contradictory results remains unclear, it seems that this adaptation is important to avoid an additional impairment of PAH in the OM group. In principle, HO-1 expression can be modulated by the transcription factor Nrf2 [48]. Nevertheless, knockout mice for Nrf2 had no decrease in HO-1 expression [49]. In the present study, the increased immunocontent of HO-1 in the OM group, as compared to SM, may have been stimulated by a Nrf2-independent signaling pathway, since Nrf2 expression did not vary between these two groups. Other transcription factors, known to be involved in the regulation of HO-1 expression, such as nuclear factor- κ B (NF- κ B), activator protein-1 (AP-1) [51], could be responsible for the results observed.

When analyzing the expression of thioredoxin (Trx-1), it was observed same profile as HO-1. Trx-1 contributes to maintaining the redox balance by its ability to reduce oxidized thiol groups [45]. In addition, thioredoxin is important to keep peroxiredoxin (Prx) in its reduced state, which is essential in the reduction of hydrogen peroxide to water [46]. It has been reported that estrogen can be protective against heart failure and apoptosis induced by angiotensin II by increasing Trx-1 levels [52]. In the present study, association between MCT and ovariectomy maintain not only Trx-1 levels, but also HO-1, besides the compensatory response of the classical antioxidants. This cardioprotective effect must be investigated. We explored whether this cardioprotection could be mediated by estrogen receptors ER- α and ER- β . In the present study, it was found, in the OM group, an augment in ER- β expression. The activation of the ER- β , but not of the ER- α , was shown to produce a lowering in blood pressure in spontaneously hypertensive rats [53]. Moreover, the use of raloxifene, that activates ER- β more effectively than ER- α , was shown to attenuate MCT-induced pulmonary hypertension [54]. In the same line, a fitoestrogen, genistein, has show efficacy in mitigating PAH, apparently through ER- β [55]. These reports point to a cardioprotection associated to ER- β , corroborating findings of the present study, in which it was not found an exacerbation of PAH as it would be expected.

MCT has also induced ER- α and this effect was associated to a diminished expression of HO-1 and Trx-1, which would be deleterious for RV. Literature suggests a possible interaction between ESR1 gene (that codifies ER- α) and the development of PAH in humans [56]. However, ER- α activation by estrogen promoted capillary formation and repair of injured vascular beds [57]. In the present study, it was observed an increase in ER- α in RV of monocrotaline groups (SM and OM) compared to its controls (S and O). This could be a compensatory response against a decreased tissue perfusion in these animals with PAH and could contribute to maintain PAP in moderate levels. In experimental models of PAH, there is no consensus in literature regarding the participation of these estrogen receptors in beneficial or deleterious responses in the development of this disease.

Conclusions

In summary, it was visualized a compensatory response of HO-1 and Trx-1 when both stimuli (MCT and ovariectomy) were applied, which probably is associated to ER- β activation. It seems that, under ovariectomy, HO-1 and Trx-1 are crucial to avoid an additional impairment of PAP and RV remodeling in the OM group. The findings of the present study are relevant for the understanding of gender differences in the pathogenesis of PAH and to bring some light into the estrogen paradox in terms of oxidative stress. Modulation of HO-1 and Trx-1 appears as an attractive antioxidant strategy that could be further explored in this experimental model.

Acknowledgements

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

Compliance with Ethical Standards

The authors declare that there are no conflicts of interest. The authors declare that the experimental procedures were performed taking into consideration the welfare of animals and were approved by the Ethics Committee for animal research at Federal University of Rio Grande do Sul.

References

- [1] Rabinovitch M. Pathobiology of pulmonary hypertension. Extracellular matrix. *Clin Chest Med* 2001; 22(3):433-449.
- [2] Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993; 328(24):1732-1739.
- [3] Waxman AB, Zamanian RT. Pulmonary arterial hypertension: new insights into the optimal role of current and emerging prostacyclin therapies. *Am J Cardiol* 2013; 111:1-16.
- [4] Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 2012; 122(12):4306-4313.
- [5] Badesch DB, Raskob GE, Elliott CG, Krichman AM, Farber HW, Frost AE et al. Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry. *Chest* 2010; 137(2):376-387.
- [6] Austin ED, Lahm T, West J, Tofovic SP, Johansen AK, Maclean MR et al. Gender, sex hormones and pulmonary hypertension. *Pulm Circ* 2013; 3(2):294-314.
- [7] Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, et al. Survival in Patients with Idiopathic, Familial, and Anorexigen-Associated Pulmonary Arterial Hypertension in the Modern Management Era. *Circulation* 2010; 122:156-163.
- [8] Martin YN & Pabelick CM. Sex Differences in the Pulmonary Circulation: implications for pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014; 306(9):1253-1264.

- [9] Umar S, Iorga A, Matori H, Nadadur RD, Li J, Maltese F et al. Estrogen rescues preexisting severe pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184(6):715-723.
- [10] Raghvendra KD, Stevan PT and Edwin KJ. Cardiovascular Pharmacology of Estradiol Metabolites. *JPET* 2004; 308:403-409.
- [11] Farhat MY, Chen MF, Bhatti T, Iqbal A, Cathapermal S, Ramwell PW. Protection by estradiol against the development of cardiovascular changes associated with monocrotaline pulmonary hypertension in rats. *Br J Pharmacol* 1993; 110(2):719-723.
- [12] Lahm T, Albrecht M, Fisher AJ, Selej M, Patel NG, Brown JA et al. 17beta-Estradiol attenuates hypoxic pulmonary hypertension via estrogen receptor-mediated effects. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185(9):965-980.
- [13] Ruiz-Larrea MB, Leal AM, Martin C, Martinez R, Lacort M. Antioxidant action of estrogens in rat hepatocytes. *Rev Esp Fisiol* 1997; 53(2):225-229.
- [14] Massafra C, Gioia D, De Felice C, Picciolini E, De Leo V, Bonifazi M et al. Effects of estrogens and androgens on erythrocyte antioxidant superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities during the menstrual cycle. *J Endocrinol* 2000; 167(3):447-452.
- [15] Zhang T, Liang X, Shi L, Wang L, Chen J, Kang C et al. Estrogen receptor and PI3K/Akt signaling pathway involvement in S-(-)equol-induced activation of Nrf2/ARE in endothelial cells. *PLoS One* 2013; 19;8(11):e79075.
- [16] Bellanti F, Matteo M, Rollo T, De Rosario F, Greco P, Vendemiale G et al. Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: Impact of estrogen therapy. *Redox Biol* 2013; 1(1):340-346.
- [17] Takano H, Zou Y, Hasegawa H, Akazawa H, Nagai T, Komuro I. Oxidative stress-induced signal transduction pathways in cardiac myocytes: involvement of ROS in heart diseases. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5(6):789-794.
- [18] Tabima DM, Frizzell S & Gladwin MT. Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. *Free Radic Biol Med* 2012; 52(9):1970-1986.
- [19] Tofovic SP, Zhang X, Jackson EK, Dacic S, Petrusevska G. 2-Methoxyestradiol mediates the protective effects of estradiol in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Vascul Pharmacol* 2006; 45(6):358-367.
- [20] Campbell SE, Febbraio MA. Effect of the ovarian hormones on GLUT4 expression and contraction-stimulated glucose uptake. *Am J Physiol Endocrin and Metabol* 2002; 282(5):1139–1146.
- [21] Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 2002; 62:609-614.

- [22] Rudski LG et al. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the Journal of the American Society of Echocardiography: official publication of the American Society of Echocardiography 2010; 23(7):685–713.
- [23] Urboniene D et al. Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010; 299(3):401–412.
- [24] Ludke ARL et al. Modulation of monocrotaline-induced cor pulmonale by grape juice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010; 55(1):89–95.
- [25] Chemla D, Castelain V, Humbert M, Hébert JL, Simonneau G, Lecarpentier Y, Hervé P. New formula for predicting mean pulmonary artery pressure using systolic pulmonary artery pressure. *Chest* 2004; 126(4):1313–1317.
- [26] Hu LW et al. Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285(6):1473–1480.
- [27] Pick E & Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38(1-2):161-170.
- [28] Valdez LB, Zaobornyj T, Boveris A. Functional activity of mitochondrial nitric oxide synthase. *Methods in Enzymol* 2005; 396:444-455.
- [29] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105:121-126.
- [30] Marklund S. Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA (ed) *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1985; 243-247.
- [31] Flohé L & Gunzler WA. Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105:114-121.
- [32] Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233:357–363.
- [33] Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med* 1991; 10(2):93–100.
- [34] Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL & Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
- [35] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680–685.

- [36] Leichsenring-Silva F et al. Association of the time course of pulmonary arterial hypertension with changes in oxidative stress in the left ventricle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011; 38(12):804–810.
- [37] Barst RJ et al. Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 43(12):40S–47S.
- [38] Ishikawa M, Sato N, Asai K et al. Effects of a Pure α/β -Adrenergic Receptor Blocker on Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension With Right Ventricular Hypertrophy in Rats. *Circ J* 2009; 73:2337–2341.
- [39] Koskenvuo JW, Mirsky R, Zhang Y, Angeli FS et al. A comparison of echocardiography to invasive measurement in the evaluation of pulmonary arterial hypertension in a rat model. *Int J Cardiovasc Imaging* 2010; 26(5):509-518.
- [40] Siqueira R, Campos C, Colombo R, Becker CU, Fernandes TR, Araújo AS, Belló-Klein A. Influence of estrogen on pulmonary arterial hypertension: role of oxidative stress. *Cell Biochem Funct* 2011; 29(7):543-548.
- [41] Colombo R, Siqueira R, Becker CU, Fernandes TG, Pires KM, Valença SS, Souza-Rabbo MP, Araujo AS, Belló-Klein A. Effects of exercise on monocrotaline-induced changes in right heart function and pulmonary artery remodeling in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2013; 91(1):38-44.
- [42] Bal, E. et al. The effects of gender difference on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Hum Exp Toxicol*.2013, 32(7):766–774.
- [43] Pichardo, J. et al. Myocardial oxidative stress changes during compensated right heart failure in rats. *Mol Cell Biochem* 1999; 196:51–57.
- [44] Yu J, Zhao Y, Li B, Sun L, Huo H. 17beta-estradiol regulates the expression of antioxidant enzymes in myocardial cells by increasing Nrf2 translocation. *J Biochem Mol Toxicol* 2012; 26(7):264-269.
- [45] Xu J, Li T, Wu H, Xu T. Role of thioredoxin in lung disease. *Pulm Pharmacol Ther* 2012; 25(2):154-162.
- [46] Karihtala P, Kauppila S, Soini Y, Arja JV. Oxidative stress and counteracting mechanisms in hormone receptor positive, triple-negative and basal-like breast carcinomas. *BMC Cancer* 2011; 11:262.
- [47] Shen X, Zheng S, Metreveli NS, Epstein PN. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 2006; 55(3):798-805.
- [48] Gozzelino R, Jeney V, Soares MP (2010) Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:323-354.

- [49] Yet SF, Perrella MA, Layne MD, Hsieh CM, Maemura K, Kobzik L, Wiesel P, Christou H, Kourembanas S, Lee ME. Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. J Clin Invest 1999; 103(8):23-29.
- [50] Belhaj A, Dewachter L, Kerbaul F, Brimiouille S et al. Heme oxygenase-1 and inflammation in experimental right ventricular failure on prolonged overcirculation-induced pulmonary hypertension. PLoS One 2013; 8(7):e69470.
- [51] Alam J, Cook JL. How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? Am J Respir Cell Mol Biol 2007; 36(2):166-174.
- [52] Ebrahimian T. et al. Differential regulation of thioredoxin and NAD(P)H oxidase by angiotensin II in male and female mice. Journal of hypertension 2007; 25(6):1263–1271.
- [53] Jazbutyte V, Arias-Loza PA, Hu K, Widder J et al. Ligand-dependent activation of ER β lowers blood pressure and attenuates cardiac hypertrophy in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. Cardiovasc Res 2008; 77:774-781.
- [54] Nishida M, Hasegawa Y, Tanida I, Nakagawa E, Inaji H, Ohkita M, Matsumura Y. Preventive effects of raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in intact and ovariectomized female rats. Eur J Pharmacol 2009; 614(1-3):70-76.
- [55] Matori, H. et al. Genistein, a soy phytoestrogen, reverses severe pulmonary hypertension and prevents right heart failure in rats. Hypertension 2012; 60(2):425–430.
- [56] Rajkumar, R. et al. Genome wide RNA expression profiling in lung identifies distinct signatures in idiopathic pulmonary arterial hypertension and secondary pulmonary hypertension. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010; 298(4):1235–1248.
- [57] Baruscotti I, Barchiesi F, Jackson EK, Imthurn B et al. Estradiol stimulates capillary formation by human endothelial progenitor cells: role of estrogen receptor- α / β , heme oxygenase 1, and tyrosine kinase. Hypertension 2010; 56(3):397-404.

Figure captions:

Figure 1: Echocardiographic images of pulmonary artery flow 21 days after monocrotaline or saline administration. The arrow represents the flow pattern through the pulmonary artery, featuring slight increase (not

significant) in pulmonary resistance. S=sham, SM=sham+monocrotaline, O=ovariectomized, OM = ovariectomized + monocrotaline.

Figure 2: Immunocontent of the factor erythroid-derived 2 (Nrf2) (A), peroxiredoxin (Prx VI) (B), superoxide dismutase (SOD) (C), glutaredoxin 1 (Grx 1) (D), heme oxygenase-1 (HO-1) (E), and thioredoxin (Trx 1) (F) in the right ventricle of animals in the experimental groups with monocrotaline or saline. Values are expressed as mean \pm SD (n = 4-6). S=sham, SM=sham+monocrotaline, O=ovariectomized, OM = ovariectomized + monocrotaline. ^aP<0.05 versus S; ^bP<0.05 versus S and O; ^cP<0.05 versus O; ^dP<0.05 versus S and SM; ^eP<0.05 versus SM.

Figure 3: Immunocontent of estrogen receptor α (ER- α) (A) and estrogen receptor β (ER- β) (B) in the right ventricle of animals in the experimental groups with monocrotaline or saline. Values are expressed as mean \pm SD (n = 4-6). S=sham, SM=sham+monocrotaline, O=ovariectomized, OM = ovariectomized + monocrotaline. ^aP<0.05 versus S; ^bP<0.05 versus S and O; ^cP<0.05 versus O; ^dP<0.05 versus S and SM; ^eP<0.05 versus SM.

Table 1: Echocardiographic, hemodynamic, and morphometric parameters

Parameters	S	SM	O	OM
Echocardiographic parameters				
AT/ET (sec/sec)	0.29 ± 0.05	0.28 ± 0.07	0.29 ± 0.09	0.28 ± 0.10
SV (mL)	0.21 ± 0.05	0.24 ± 0.03	0.23 ± 0.05	0.25 ± 0.04
CO (mL/min)	47.57 ± 12.07	52.75 ± 7.54	55.17 ± 14.34	59.88 ± 9.58
Hemodynamic parameters				
RVEDP (mmHg)	2.16 ± 1.06	2.85 ± 0.49	2.24 ± 0.81	3.30 ± 1.28
RVSP (mmHg)	25.98 ± 6.8	35.88 ± 7.07 ^{a,b}	25.18 ± 4.87	37.22 ± 12.14 ^{b,c}
PAP (mmHg)	17.85 ± 4.15	23.89 ± 4.31 ^{a,b}	17.36 ± 2.97	24.71 ± 7.41 ^{b,c}
Morphometric parameters				
FBW (g)	255.14 ± 17.38	246.14 ± 20.24	262.83 ± 26.72	251.67 ± 19.93
RV weight (g)	0.148 ± 0.02	0.154 ± 0.02	0.152 ± 0.03	0.166 ± 0.02
RV / FBW (g/g)	0.58 ± 0.06	0.63 ± 0.08	0.58 ± 0.05	0.67 ± 0.13
RV / tibia (g/mm)	4.22 ± 0.68	4.44 ± 0.44	4.29 ± 0.54	4.84 ± 0.76
Uterine weight (mg)	0.48 ± 0.09	0.43 ± 0.07	0.14 ± 0.03 ^{a,d}	0.14 ± 0.03 ^{d,e}

Values are expressed as mean ± SD (n=6-7). S=sham, SM=sham+monocrotaline, O=ovariectomized, OM=ovariectomized+monocrotaline, AT/ET= pulmonary acceleration to ejection time flow ratio, SV=systolic volume, CO=cardiac output, RVEDP=right ventricle end-diastolic pressure, RVSP=right ventricle systolic pressure, PAP=pulmonary artery pressure, FBW=final body weight, RV= right ventricle. ^a P<0.05 versus S; ^b P<0.05 versus S and O; ^c P<0.05 versus O; ^d P<0.05 versus S and SM; ^e P<0.05 versus SM.

Table 2: Oxidative stress parameters

Parameters	S	SM	O	OM
NOS (nmolesNO/min/mg prot)	1.18 ± 0.43	0.79 ± 0.15 ^{a b}	0.81 ± 0.22 ^d	0.57 ± 0.14 ^{d b}
SOD (U/mg prot)	9.74 ± 2.4	11.26 ± 1.28 ^b	9.99 ± 1.44	10.92 ± 2.15 ^b
H ₂ O ₂ (nmol/mg tecido)	192.7 ± 45.8	261.9 ± 58.2 ^{a b}	186.1 ± 80.7	254.4 ± 72.6 ^{b c}
CAT (pmol/mg prot)	19.57 ± 7.92	28.83 ± 9.02 ^{a b}	21.41 ± 7.64	25.89 ± 6.24 ^b
GPx (nmol/min/mg prot)	26.58 ± 8.59	40.30 ± 9.04 ^{a b}	30.50 ± 7.13	29.82 ± 7.22 ^b
CL (cps/mg prot)	155364 ± 33593	174951 ± 49378	152813 ± 17798	148942 ± 32942
Carbonyls (nmol/mg prot)	13.8 [11.4 - 14]	13.8 [12.3 -14.1]	13.9 [9.3 – 14.2]	10.4 [8.6 – 13.4]

Values are expressed as mean ± SD (n=6-7). Values of carbonyls were expressed as medians and interquartile intervals. S=sham, SM=sham+monocrotaline, O=ovariectomized, OM=ovariectomized+monocrotaline, NOS=nitric oxide synthase, SOD=superoxide dismutase, H₂O₂=hydrogen peroxide, CAT=catalase, GPx=glutathione peroxidase, CL=chemiluminescence. ^aP<0.05 versus S; ^bP<0.05 versus S and O; ^cP<0.05 versus O; ^dP<0.05 versus S and SM.

Figure 1

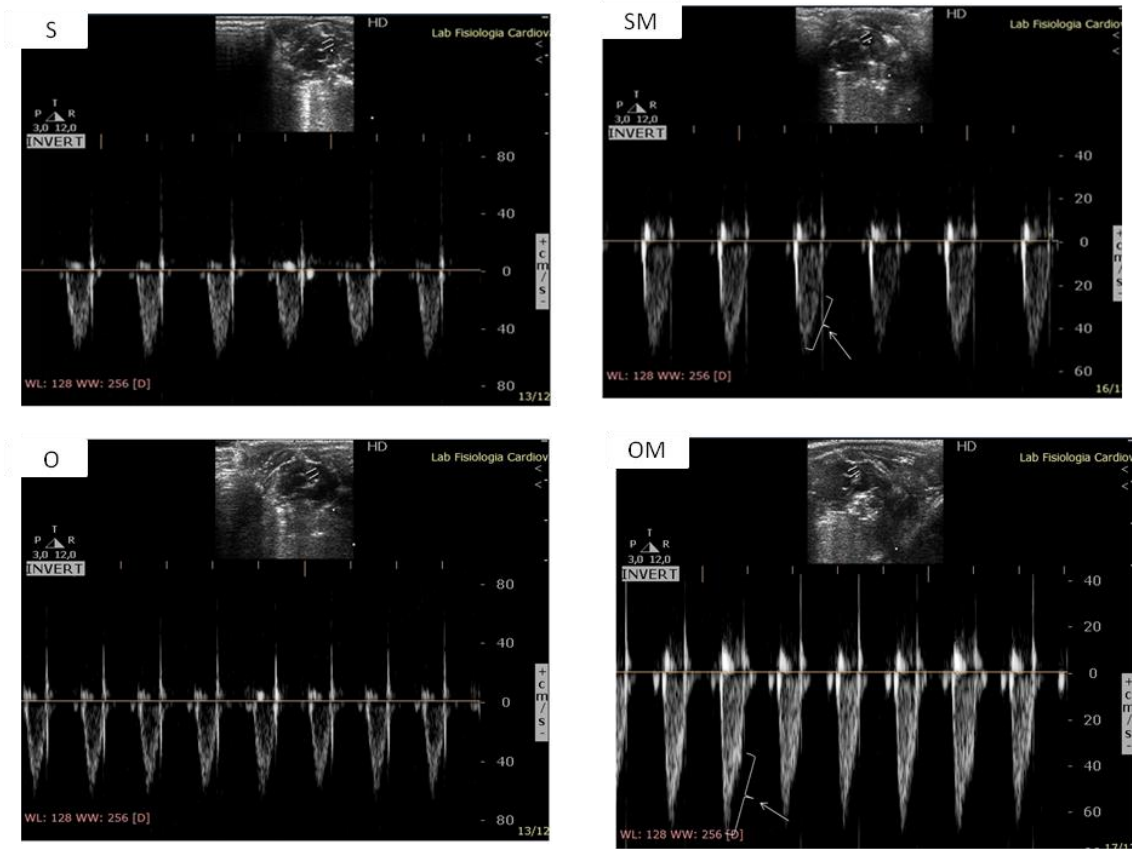


Figure 2

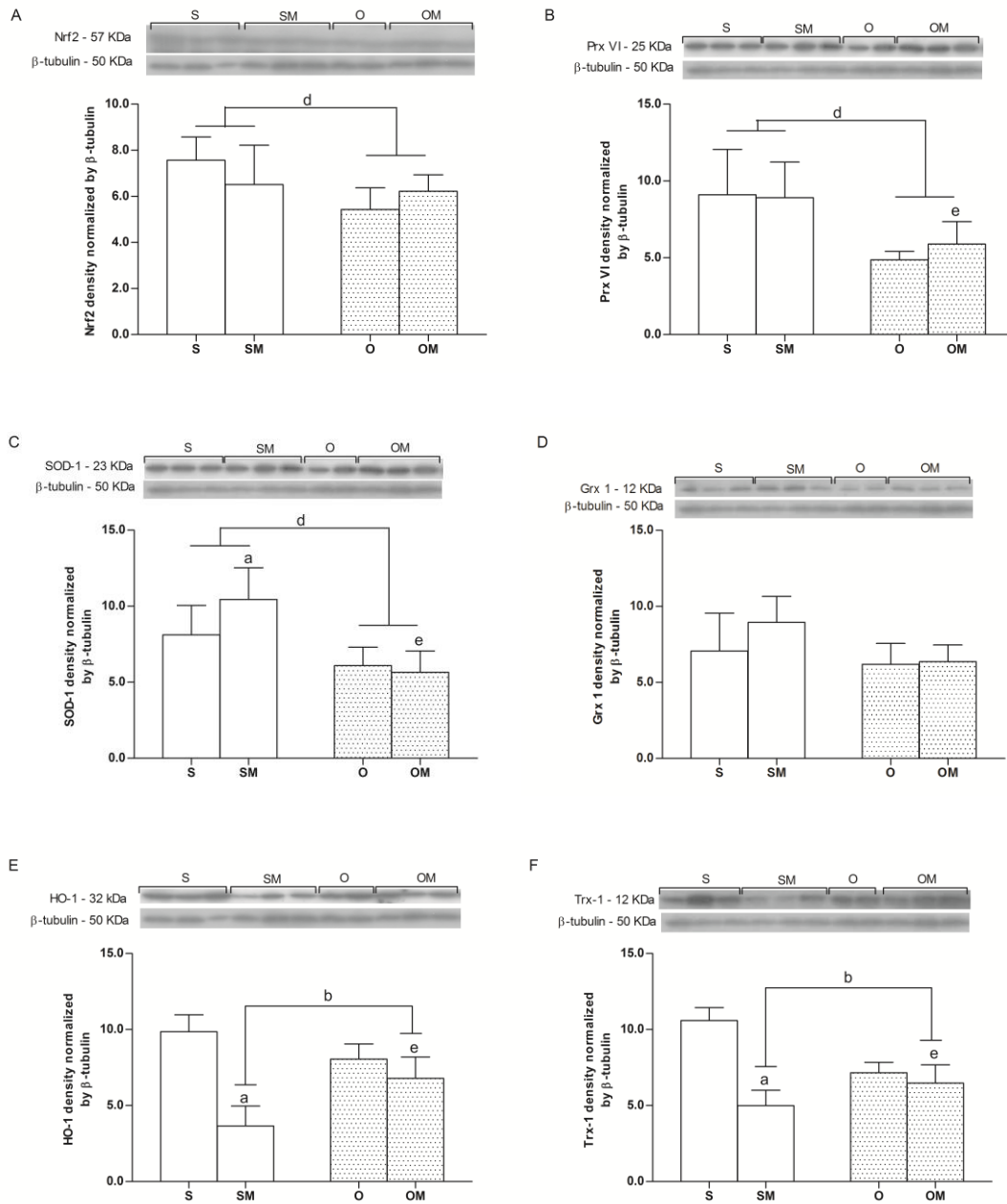


Figure 3

