

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO SOBRE O METABOLISMO
DO ÓXIDO NÍTRICO E DA ENDOTELINA-1 E SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO NO PARÊNQUIMA PULMONAR DE RATOS COM
HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR**

ALEXSANDRA ZIMMER

PORTO ALEGRE

2016

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 DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO SOBRE O METABOLISMO
DO ÓXIDO NÍTRICO E DA ENDOTELINA-1 E SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO NO PARÊNQUIMA PULMONAR DE RATOS COM
HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR**

Dissertação 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 Mestre em Ciências Biológicas – Fisiologia

Alexsandra Zimmer

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

Coorientador: Dr. Prof. Rafael Colombo

PORTO ALEGRE

2016

AGRADECIMENTOS

Registro meus sinceros agradecimentos a todos os que compartilharam o andar de mais esse caminho trilhado, contribuindo, direta e indiretamente, com a conclusão deste trabalho, me auxiliando e dando forças nos momentos em que precisei.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pela força e luz, sendo meu conforto e refúgio nas horas difíceis e fonte de renovação nos momentos de prazer e realização. A ele, dedico meu eterno amor e gratidão.

À minha família, meu porto seguro, pelo suporte vital e amor incondicional durante esse trajeto. Pai Atanásio, Mãe Juceli, Irmã Angélica e cunhado Gustavo, sou grata a vocês, por terem entendido minhas mudanças durante todo meu crescimento. Por terem me ouvido e dado respostas claras e breves às dúvidas que pairavam sobre mim e sobre a minha capacidade. Por terem reforçado a minha confiança, em inúmeros momentos, me aplaudindo de pé em cada nova etapa concluída. Por terem servido de cobaias, como meus alunos, durante os ensaios para a prova de qualificação e, por terem considerado meus sentimentos e necessidades, bem como apoiado a ideia da realização dessa importante etapa da minha vida. Tudo que sou hoje agradeço a vocês, que correspondem minha base existencial e, para quem eu serei eternamente grata.

Agradeço a uma das pessoas que mais conviveu comigo durante toda essa caminhada, me dando apoio, força e muito amor, sempre disposto a compreender o que eu fazia durante as inúmeras horas em que fiquei no laboratório ou estudando. Você sempre esteve lá quando eu chamei e se mostrou feliz por poder ajudar. Além do que, toda vez que eu precisei, “não há problema”, você me dizia. Por tudo isso, eu compreendi o verdadeiro significado de companheirismo estabelecido numa relação. Obrigada por tudo meu grande amor. Te amo muito Rogi!

A minha orientadora, Dra. Prof. Adriane Belló-Klein, que me recebeu com as portas abertas no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, acreditando nas minhas potencialidades, me incentivando a construir e desenvolver meu conhecimento. Agradeço pela paciência comigo, pelos laços de solidariedade intelectual instaurados e que levarei com carinho durante toda a minha vida. Cumpru não apenas com seu papel de ótima orientadora, aconselhando, gerenciando, planejando e contribuindo na minha autonomia intelectual, mas foi fundamental como pilar para meus momentos difíceis.

“Profe”, não tenho palavras para descrever minha gratidão pela confiança e carinho depositados em mim.

Ao meu coorientador, Dr. Prof. Rafael Colombo, que me cativou nas suas aulas de Fisiologia, lá do tempo da graduação, me incentivando à busca de conhecimento nessa área. Obrigada por todos os seus conselhos, correções, risadas, conversas e, que sempre de uma forma alegre, contribuiu para realização de mais essa etapa da minha vida.

Aos demais professores do Programa de Pós-graduação em Fisiologia da UFRGS, que por meio dos seus conhecimentos, me ensinaram novos saberes, aguçando ainda mais a minha vontade de estudar e entender os processos fisiológicos.

Ao Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, por ter me recebido de forma tão carinhosa e, que permitiu a realização desse trabalho, oferecendo todos os seus recursos disponíveis.

A todos os componentes e ex-componentes do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Professores Alex Sander e Paulo Schenkel, técnica Tânia e demais: Jéssica, Rafaela, Cristina, Patrick, Giana, Bruna, Rafael, Vanessa, Denise, Alexandre, Luiza e Dalvana pelo companheirismo, apoio e amizades construídas durante esse período.

Em especial, destaco meu agradecimento também, a amiga do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Rayane, pois esteve comigo e compartilhou todos os momentos do mestrado, sempre envolvida e disposta a me auxiliar no meu trabalho e, sem a qual, eu não teria conseguido finalizar. Além de me ensinar muito em conhecimentos, se criou e fortaleceu em nós, companheirismo e parceria. Muito obrigada Ray, por tudo!

Aos professores Isnard e Alessandra, da Universidade de Caxias do Sul, que aceitaram a parceria para realização das análises imuno-histoquímicas.

Referências aos meus amados amigos, Rubiele, Thomás e Taiane que estiveram comigo, mesmo de longe, presentes em todos os momentos, com seus pensamentos e orações. O apoio de vocês foi importante nessa caminhada. É muito bom saber que sempre que “olharmos” para o lado, haverá alguém com quem contar, pessoas estas, que não nos deixam desanimar, muito menos desistir. Amigos que nos dão palavras de

coragem e que junto comigo, choraram e sorriram. Eu tive a sorte grande de ter conhecido vocês na graduação e da nossa amizade ter ficado cada dia mais forte.

E por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer aos meus sogros, Neiva e Ivo, que me receberam muito bem na sua família e me apoiaram em toda a minha caminhada. Amo vocês.

“Por vezes sentimos que aquilo que
fazemos não é senão uma gota de
água no mar. Mas o mar seria menor
se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

A Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP) é uma patologia grave e incapacitante, caracterizada por modificações bioquímicas, morfofuncionais e estruturais que gera aumento progressivo da resistência vascular pulmonar (RVP), da pressão arterial pulmonar média (PAPm) e alterações no ventrículo direito (VD) que culminam com a insuficiência cardíaca direita (ICD), seguida de óbito. O efeito do exercício físico aeróbio sobre o estresse oxidativo e sobre o metabolismo do óxido nítrico (NO) e endotelina-1 (ET-1), no tecido pulmonar é desconhecido. Assim, este estudo teve como objetivo verificar a influência de um protocolo de exercício físico sobre o estresse oxidativo pulmonar e o seu papel modulador no metabolismo do NO e da ET-1 em ratos com HAP. Para isso, foram utilizados 28 ratos machos Wistar, divididos em quatro grupos experimentais (5-7 animais): CS (controle sedentário), MS (monocrotalina sedentário), CT (controle treinado) e MT (monocrotalina treinado). Os animais dos grupos CT e MT participaram de duas semanas de pré-treinamento em esteira adaptada para ratos. No final desse período, os animais dos grupos MS e MT receberam dose única (60 mg/Kg) intraperitoneal de monocrotalina (MCT), enquanto que os animais dos grupos CS e CT, receberam salina na mesma dose. Em seguida, os animais dos grupos CT e MT foram submetidos a três semanas de treinamento aeróbio, com frequência de cinco vezes por semana e utilização de 60% do VO₂ máximo. Análises ecocardiográficas foram realizadas 24 horas após a última sessão de exercício físico aeróbio. Os parâmetros de tempo de aceleração/tempo de ejeção do fluxo pela artéria pulmonar (TAC/TEJ), volume sistólico (VS), débito cardíaco (DC), excursão sistólica do plano do anel da tricúspede (TAPSE), fração de enchimento (FEC), mudança da área fracional (FAC), índice de performance do miocárdio (IPM) e velocidade de enchimento rápido/lento do ventrículo direito (E/A) foram analisados e, em seguida, os ratos foram mortos por sobrecarga anestésica, confirmada por deslocamento cervical. Seus órgãos (coração, fígado e pulmão) foram coletados para realização posterior das análises. A massa do coração foi utilizada para analisar a hipertrofia cardíaca (HC) e a massa do fígado, para analisar a congestão hepática. O lobo direito do pulmão foi separado para realização das análises bioquímicas e moleculares e, o lobo esquerdo para realização das análises imuno-histoquímicas. A administração de MCT promoveu hipertrofia do VD, redução dos parâmetros TAC/TEJ, DC, VS e TAPSE, sendo que o exercício físico aeróbio acentuou essa redução nas análises do TAC/TEJ e DC. Nos

demais parâmetros ecocardiográficos e na congestão hepática, não encontramos diferenças significativas entre os grupos experimentais. Nos resultados bioquímicos encontramos aumento da concentração do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) nos grupos MCT, principalmente no grupo MT, inalteração da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e da atividade da enzima NADPH Oxidase (NOX). Em relação às enzimas antioxidantes, encontramos redução da atividade da superóxido dismutase (SOD) nos animais que participaram do protocolo de treinamento físico e inalteração da sua expressão por Western Blot. A catalase (CAT), por sua vez, teve sua atividade reduzida nos animais que receberam MCT e também na sua expressão no grupo MS quando comparado ao CS. Já o grupo MT teve aumento da expressão da CAT quando comparado ao grupo MS. Em relação à atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) houve aumento nos grupos que receberam a MCT, principalmente no grupo MT. Encontramos ainda, redução nos danos oxidativos a proteínas e lipídios nos grupos que receberam MCT. O metabolismo do NO também foi afetado, uma vez que evidenciamos redução da atividade da óxido nítrico sintase (NOS) nos animais que participaram do protocolo de treinamento aeróbio e também naqueles que receberam a MCT. A concentração de nitritos totais e da expressão de enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais. Houve aumento na marcação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e na nitrotirosina em arteríolas pulmonares dos animais que receberam MCT, sendo mais acentuada nos animais do grupo MT. Ainda, não encontramos alterações significativas na expressão do receptor A (ET-A) da ET-1, mas sim, redução da expressão do receptor B (ET-B). Em conclusão, o modelo experimental de HAP induzido por MCT, foi reproduzido nesse estudo e a realização do protocolo de treinamento físico mostrou-se incapaz de atenuar e/ou reverter as alterações no metabolismo do NO e da ET-1, bem como o aumento do estresse oxidativo causados pela droga, no tecido pulmonar. Na verdade, em muitas análises, foram encontrados efeitos prejudiciais do exercício físico, potencializando a progressão e severidade da doença.

Palavras-chave: Hipertensão Arterial Pulmonar, monocrotalina, exercício físico aeróbio, disfunção endotelial e estresse oxidativo.

ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a serious and disabling condition characterized by biochemical, morphological, functional and structural alterations, which generate a progressive increase in pulmonary vascular resistance (PVR) and in mean pulmonary arterial pressure (mPAP), together with changes in right ventricle (RV). This scenario leads to right heart failure, followed by death. The effects of aerobic exercise on oxidative stress, metabolism of nitric oxide (NO) and endothelin-1 (ET-1) in lung tissue are unknown. This study aimed to verify the influence of a physical exercise protocol on pulmonary oxidative stress and also the modulatory role of exercise in the metabolism of NO and ET-1 in rats with PAH. Then, 28 male Wistar rats were used, divided into four groups (5-7 animals/group): SC (sedentary control), SM (sedentary monocrotaline), TC (trained control), and TM (trained monocrotaline). Animals of TC and TM groups participated in two weeks of pre-training on a treadmill adapted to rats. At the end of this period, the animals of TM and SM groups received a single injection (60 mg/kg, i.p.) of monocrotaline (MCT), whereas animals of SC and TC groups received saline at the same volume. Then, the animals of TC and TM groups underwent three weeks of aerobic training, five times a week, using 60% of maximum VO_2 . Echocardiographic analysis was performed 24 hours after the last aerobic exercise session. The parameters of acceleration /ejection time of pulmonary artery flow (AT/ET), stroke volume (SV), cardiac output (CO), tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE), filling fraction (FF), fractional area change (FAC), myocardial performance index (MPI) and fast/slow rate of right ventricular filling (E/A ratio) were analyzed, and then rats were euthanized with anesthetic overload, confirmed by cervical dislocation. Heart, liver and lungs were collected to perform later analysis. Heart mass was used to analyze cardiac hypertrophy (CH), and liver mass to analyze hepatic congestion. The right lobe of lung was separated to biochemical and molecular measurements and the left lobe to perform immunohistochemical analysis. The administration of MCT promoted RV hypertrophy, and reduced AT/ET, CO, SV, and TAPSE. However, aerobic exercised groups had an accentuated reduction in the analysis of the AT/ET and CO. We found no significant differences between the experimental groups in other echocardiographic parameters and liver congestion analysis. Biochemical results showed increased concentrations of superoxide radical ($\text{O}_2\cdot^-$) in the MCT group, especially in the TM group, with no changes in hydrogen

peroxide concentration (H_2O_2) and NADPH oxidase enzyme activity (NOX). Regarding the antioxidant enzymes, we found reduced activity of superoxide dismutase (SOD) in animals that underwent physical training protocol, with no changes in expression by Western blot. Catalase (CAT), in turn, reduced its activity in animals that received MCT and in its expression in the SM group, when compared to SC. However, animals in TM group had increased expression of CAT when compared to SM group. Regarding the activity of glutathione peroxidase enzyme (GPx) there was an increase in the groups that received MCT, mainly in the TM group. The groups that received MCT presented reduction in oxidative damage to proteins and lipids. NO metabolism was also affected, once reduction in the activity of nitric oxide synthase (NOS) was observed in animals that participated in the aerobic training protocol and also in those who received MCT. The concentration of total nitrites and the endothelial nitric oxide synthase enzyme (eNOS) expression showed no significant differences between the different experimental groups. There was an increase in the immunohistochemical analysis of the inducible nitric oxide synthase enzyme (iNOS) and nitrotyrosine in pulmonary arterioles of animals that received MCT, being more pronounced in the animals of TM group. Although no significant changes in the A receptor of ET-1 (ET-A) expression were identified, it was detected a decrease in the B receptor of ET-1 (ETB) expression. In conclusion, the experimental model of PAH induced by MCT was reproduced in this study and physical training protocol execution proved to be unable to mitigate and/or reverse changes in the metabolism of NO and ET-1, as well as the increased oxidative stress caused by the drug in lung tissue. In fact, in many analyzes, harmful effects of exercise were found, contributing to progression and severity of the disease.

Keywords: Pulmonary Arterial Hypertension, monocrotaline, aerobic exercise, endothelial dysfunction and oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Artéria saudável e na disfunção endotelial	26
Figura 2. Processo básico da síntese de NO.	28
Figura 3. Principais fatores estimuladores e inibidores da síntese de ET-1	32
Figura 4. Resumo das ações da ET-1 mediada por receptores acoplados a proteína G	34
Figura 5. Distribuição dos elétrons na orbital externa da molécula de oxigênio e redução da molécula de água, justificando a formação de espécies reativas de oxigênio na cadeia de transporte de elétrons	36
Figura 6. Alterações celulares na HAP.....	39
Figura 7. Progressão da HAP e desenvolvimento da ICD	39
Figura 8. Modelo de HAP induzida por MCT.....	45
Figura 9. Desenho experimental.....	51
Figura 10. Massa corporal (g) nos distintos grupos experimentais durante todo o protocolo experimental.....	61
Figura 11. Massa corporal final (g) nos distintos grupos experimentais no último dia do protocolo experimental.....	62
Figura 12. Concentração do O_2^- ($\mu\text{mol/L/mg prot.}$) em homogeneizado de pulmão ...	66
Figura 13. Concentração de H_2O_2 (nmol/mg prot.) em homogeneizado de pulmão.....	66
Figura 14. Atividade da NADPH oxidase (nmol/min.mg prot.) em homogeneizado de pulmão	67
Figura 15. Atividade da SOD em homogeneizado de pulmão	68
Figura 16. Imunoconteúdo da SOD (%) em homogeneizado pulmonar	68
Figura 17. Atividade da CAT (pmol/mg prot.) em homogeneizado de pulmão.....	69
Figura 18. Imunoconteúdo da CAT (%) em homogeneizado pulmonar	70
Figura 19. Atividade da GPx (nmol/min/mg prot) em homogeneizado de pulmão	71
Figura 20. Lipoperoxidação por QL (cps/mg prot. $\times 10^{-4}$) em homogeneizado de pulmão	72
Figura 21. Dano oxidativo a proteínas (nmoles/mg prot.).....	72
Figura 22. Concentração de NO_2^- totais (nmol/L) em homogeneizado de pulmão.....	73
Figura 23. Atividade da NOS (nmol/min/mg prot.) em homogeneizado de pulmão	74
Figura 24. Imunoconteúdo da eNOS (%) em homogeneizado pulmonar	75

Figura 25. Imunohistoquímica para o marcador iNOS em arteríola pulmonar (ampliação de 400x)	76
Figura 26. Imunohistoquímica para o marcador nitrotirosina em arteríola pulmonar (ampliação de 400x)	77
Figura 27. Imunoconteúdo do receptor A da ET-1 (ET-A) em homogeneizado pulmonar.....	78
Figura 28. Imunoconteúdo do receptor B da ET-1 (ET-B) em homogeneizado pulmonar	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação atualizada da HP, a partir do 5º Simpósio Mundial de HP, ocorrido em Nice, 2013	22
Tabela 2. Protocolo de treinamento físico baseado em Rodrigues et al, 2007.	52
Tabela 3. Anticorpos utilizados nas análises por Western Blot.....	58
Tabela 4. Parâmetros morfométricos (índices de hipertrofia cardíaca e do VD)..	63
Tabela 5. Parâmetros morfométricos (índices de congestão hepática).....	63
Tabela 6. Parâmetros ecocardiográficos do ventrículo direito	65
Tabela 7. Marcação de iNOS em pulmão esquerdo.	75
Tabela 8. Marcação de nitrotirosina em pulmão esquerdo.	76
Tabela 9. Comparação geral entre os animais MS e MT.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS

% - porcentagem

$^1\text{O}_2$ – oxigênio singlet

aa – aminoácidos

ADH – hormônio antidiurético

Ang-II – angiotensina II

BH₄ – 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina

Big-ET-1 – big-endotelina-1

BMPR2 – receptor da proteína morfogenética óssea tipo 2

Ca²⁺ – cálcio

CaCl₂ – cloreto de cálcio

CAT – catalase

cm - centímetro

cps – contagens por segundo

CREAL – Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

CS – controle sedentário

CT – controle treinado

DAG – diacilglicerol

DC – débito cardíaco

DMCT - dehidromonocrotalina

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNPH – 2,4 dinitro fenil hidrazina

DO – densidade óptica

DPI – doença pulmonar intersticial

DPOC – doença pulmonar obstrutiva crônica

DRS – doença respiratória do sono

E/A – velocidade de enchimento rápido/lento do ventrículo direito

ECE – enzima conversora de endotelinas

ECE-1- enzima conversora de endotelinas 1

ECE-2 – enzima conversora de endotelinas 2

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

ERNs – espécies reativas de nitrogênio

EROs – espécies reativas de oxigênio

ET-1 – endotelina -1

ET-A – receptor da endotelina-1 A

ET-B – receptor da endotelina-1 B

ETs – endotelinas

FAC – mudança da área fracional

FAD – flavina adenina dinucleotídeo

FEC – fração de enchimento

FMN – flavina mononucleotídeo

g – grama

G6DP – glicose-6-fosfato desidrogenase

GC – guanilato ciclase

GCs – guanosina ciclase solúvel

GMPc – monofosfato de guanosina cíclico

Gp91-phox – NOX2

GPx – glutathione peroxidase

GSH – glutathione reduzida

GSSG – glutathione oxidada

GTP – trifosfato de guanosina

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HAP – hipertensão arterial pulmonar

HbO₂ – oxi-hemoglobina

HC – hipertrofia cardíaca

HCF – hipertrofia cardíaca fisiológica

HE – hematoxilina e eosina

HEPES – Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazina]-etanosulfônico

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HP – hipertensão pulmonar

HPTC – hipertensão pulmonar tromboembólica crônica

HPV – hipertensão pulmonar venosa

HR – frequência cardíaca no momento de fluxo pela artéria pulmonar

i.p. – intraperitoneal

IC – insuficiência cardíaca

ICC – insuficiência cardíaca crônica

ICD – insuficiência cardíaca direita

IL-1 – interleucina-1

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

IP₃ – trifosfato de inositol

IPM – índice de performance do miocárdio

K⁺ – potássio

KCl – cloreto de potássio

Kg – quilograma

L – litro

L-Arg – L-arginina

LPO – lipoperoxidação

M – metal

MAPK – proteíno-quinases ativadas por mitógenos

MCT – monocrotalina

MCTP - pirrol da monocrotalina, dehidromonocrotalina

mg – miligrama

MgCl₂ – cloreto de magnésio

min - minuto

MS – monocrotalina sedentário

MT – monocrotalina treinado

N₂O₃ – trióxido de dinitrogênio

NaCl – cloreto de sódio

NADH – dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NADPH – fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NaH₂PO₄ – fosfato monossódico

NaOH – hidróxido de sódio

nmol - nanomol

nNOS – óxido nítrico sintase neuronal

NO – óxido nítrico

NO₂ – dióxido de nitrogênio

NO₂⁻ - nitritos

NO₃⁻ - nitratos

NOS – óxido nítrico sintase

NOX – NADPH Oxidase

O₂ – oxigênio

O₂⁻ – ânion superóxido

OH[·] – radical hidroxil

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONOO⁻ – peróxinitrito

PAcsa – área de secção transversal da artéria pulmonar

PAd – diâmetro da artéria pulmonar durante a sístole ventricular

PAPm – pressão média na artéria pulmonar

PAS – pressão arterial sistêmica

PKC – proteína quinase C

PKG – proteína cinase G

PLC – fosfolipase C

PMSF – fluoreto de fenil metil sulfonil

PNA – peptídeo natriurético atrial

Prot. – proteína

PRS – solução de vermelho de fenol

PVDF – fluoreto polivinidileno

QL – quimiluminescência

RVP – resistência vascular pulmonar

SDS-PAGE – gel de eletroforese de poliacrilamida duodecilsulfato de sódio

SOD – superóxido dismutase

TAC/TEJ – tempo de aceleração/tempo de ejeção do fluxo pela artéria pulmonar

TAPSE – excursão sistólica do plano do anel da tricúspede

TCA – ácido tricloroacético

TGF β – fator de crescimento tumoral β

UCS – Universidade de Caxias do Sul

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

VD – ventrículo direito

VE – ventrículo esquerdo

VO_{2max} – consumo máximo de oxigênio

VS – volume sistólico

VTI – integral velocidade tempo

XO – xantina oxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 HIPERTENSÃO PULMONAR.....	21
1.1.1 Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP)	24
1.1.2 Função Endotelial e HAP	24
1.1.3 Estresse oxidativo e HAP	24
1.1.4 Remodelamento Vascular e Cardíaco na HAP	24
1.1.5 Exercício Físico e HAP	24
1.1.6 Modelo Experimental de HAP	24
2 HIPÓTESE	47
3 OBJETIVO GERAL	48
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	49
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS – TAMANHO AMOSTRAL	49
4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	50
4.3.1 Desenho experimental	50
4.3.2 Protocolo de Exercício Físico Aeróbio	51
4.4 ANÁLISE ECOCARDIOGRÁFICA	52
4.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA	53
4.6 PREPARAÇÃO DOS HOMOGENEIZADOS	53
4.7 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	54
4.8 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS	54
4.8.1 Determinação da concentração de Ânion Superóxido ($O_2^{\cdot -}$)	54
4.8.2 Determinação da concentração de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)	54
4.8.3 Atividade da NADPH Oxidase	55
4.8.4 Atividade das Enzimas Antioxidantes	55
4.8.4.1 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)	55
4.8.4.2 Atividade da Enzima Catalase (CAT)	55
4.8.4.3 Atividade da Enzima Glutationa Peroxidase (GPx)	56
4.8.5 Lipoperoxidação por Quimiluminescência (QL)	56
4.8.6 Avaliação do Dano Oxidativo a proteínas (Carbonilas)	56
4.8.7 Nitritos Totais (NO_2^-)	57

4.8.8 Atividade da enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS)	57
4.9 AVALIAÇÃO POR WESTERN BLOT.....	57
4.10 AVALIAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS	58
4.11 ANÁLISE ESTTÍSTICA	59
5 RESULTADOS	60
5.1. MASSA CORPORAL	60
5.2 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA – HIPERTROFIA CARDÍACA.....	62
5.3 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA – CONGESTÃO HEPÁTICA	63
5.4 PARÂMETROS ECOCARDIOGRÁFICOS DO VD.....	64
5.5 MEDIDAS BIOQUÍMICAS.....	65
5.5.1 Espécies reativas de oxigênio e suas fontes	65
5.5.1.1 Concentração do Ânion Superóxido (O_2^-)	65
5.5.1.2 Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2).....	66
5.5.1.3 Atividade da NADPH Oxidase.....	67
5.5.2 Enzimas Antioxidantes	67
5.5.2.1 Atividade e imunoconteúdo da Enzima SOD.....	67
5.5.2.2 Atividade e imunoconteúdo da Enzima CAT.....	69
5.5.2.3 Atividade da Enzima GPx	70
5.5.3 Dano Oxidativo	71
5.5.3.1 Lipoperoxidação por QL	71
5.5.3.2 Dano a proteínas (carbonilas).....	72
5.5.4 Metabolismo do NO	73
5.5.4.1 NO_2^- Totais	73
5.5.4.2 Atividade da Enzima NOS	73
5.5.4.3 Imunoconteúdo da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS).....	74
5.5.4.4 Presença de marcação para iNOS	75
5.5.4.5 Presença de marcação para nitrotirosina	76
5.5.5 Metabolismo da ET-1	77
5.5.5.1 Imunoconteúdo do receptor A da endotelina-1 (ET-A).....	77
5.5.5.2 Imunoconteúdo do receptor B da endotelina-1 (ET-B).....	78
6 DISCUSSÃO	80
7 CONCLUSÃO	95
8 PERSPECTIVAS	96
REFERÊNCIAS	97

1 INTRODUÇÃO

As doenças relacionadas aos sistemas cardiovascular e respiratório representam um grande custo social, sendo responsáveis pelas maiores taxas de morbidade e mortalidade na população em geral (OTA e PERERIRA, 1998; JARDIM e NASCIMENTO, 2007; ENACHE, et al, 2013; MONTANI et al., 2013). Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) preveem que, no ano de 2020, cerca de 40% dos óbitos estejam relacionados a doenças cardiovasculares. Uma dessas principais doenças é a insuficiência cardíaca (IC), que pode ser gerada por alterações crônicas na pré-carga ou pós-carga impostas ao coração. A Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP), como veremos mais adiante, é uma doença que leva ao declínio e a insuficiência do lado direito do coração, devido a um aumento de pós-carga (AUSTIN et al., 2013; LAI et al., 2014).

1.1 HIPERTENSÃO PULMONAR

A Hipertensão Pulmonar (HP) é uma condição severa, progressiva e incapacitante, caracterizada por um remodelamento irreversível nos vasos pulmonares de resistência, aumento do tônus vascular pulmonar e trombose *in situ* (RUNO e LOYD, 2003; RUBIN, 2004; FARBER e LOSCALZO, 2004; SCHERMULY et al., 2011). Sabe-se que o valor normal da pressão arterial pulmonar média (PAPm) em repouso é 14 ± 3.3 mmHg, tendo como limite superior normal o valor de 20,6 mmHg. Clinicamente, a HP é definida pela presença de uma PAPm igual ou superior a 25 mmHg em repouso e, uma pressão de oclusão da artéria pulmonar menor que 15 mmHg (MONTANI et al., 2013). A definição da HP tendo como base uma PAPm superior a 30 mmHg durante o exercício físico não tem suporte na literatura, uma vez que pessoas saudáveis podem atingir valores superiores a este durante a execução de seus treinos. Assim, ao final do 4º Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar, ocorrido em 2008, em Dana Point, essa classificação foi reavaliada e removida (BADESCH et al., 2009).

Essa doença modifica as características básicas da circulação pulmonar, alterando a velocidade do fluxo sanguíneo e/ou a resistência vascular (FARHAT et al., 1993). Uma função da circulação pulmonar é interagir com o débito ventricular direito, preservando

as pressões pulmonar e capilar em níveis extremamente baixos. Por ser uma patologia progressiva que decorre de alterações vasculares, provoca redução paulatina do lúmen, resultando em elevação da resistência vascular pulmonar (RVP), da PAPm, da sobrecarga imposta ao ventrículo direito (VD), seguida de disfunção e insuficiência desse mesmo ventrículo (AUSTIN et al., 2013). Estudos evidenciam que, mesmo com todos os avanços na área farmacêutica com o objetivo de reverter os sintomas da doença, as taxas de morbidade e mortalidade ainda são elevadas, tornando a HP uma doença com característica fatal, como demonstrado em um estudo realizado em 2010, onde foi observado que após três anos do diagnóstico, a taxa de mortalidade correspondia a 58% (HUMBERT et al., 2010).

A primeira classificação da HP ocorreu em 1973 e, desde então, esta passou por uma série de mudanças. A classificação vigente, preconizada em 2013, em Nice, durante o quinto Simpósio Mundial, divide a HP em cinco grandes categorias, organizadas conforme os parâmetros clínicos comuns, mecanismos etiológicos e respostas aos tratamentos, apresentadas na tabela 1 (SIMONNEAU, et al, 2013).

Tabela 1. Classificação atualizada da HP, a partir do 5º Simpósio Mundial de HP, ocorrido em Nice, 2013. (Retirado e adaptado de Simonneau et al., 2013).

Classificação de Hipertensão Pulmonar	
5º Conferência Mundial em Hipertensão Pulmonar Nice (2013)	
1. Hipertensão Arterial Pulmonar	
1.1.	HAP Idiopática;
1.2.	Hereditária;
1.2.1.	BMPR2;
1.2.2.	ALK 1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3
1.3.	Induzida por drogas e toxinas;
1.4.	Associada com
1.4.1.	Doenças do tecido conectivo;
1.4.2.	Infecção por HIV;
1.4.3	Hipertensão Portal;
1.4.4	Doença Cardíaca Congênita;
1.4.5.	Esquistossomose.

1'. Doença pulmonar veno-oclusiva e hemangiomatose capilar pulmonar.	

1". Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido.

2. Hipertensão Pulmonar causada por doenças do coração esquerdo

- 2.1. Disfunção sistólica;
 - 2.2. Disfunção diastólica;
 - 2.3. Doença valvular;
 - 2.4. Outras doenças congênitas que levam à disfunção cardíaca primária
-

3. Hipertensão pulmonar causada por doenças pulmonares e / ou hipóxia

- 3.1. Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC);
 - 3.2. Doença intersticial pulmonar;
 - 3.3. Outras doenças de padrão misto (restritivo e obstrutivo);
 - 3.4. Distúrbios respiratórios do sono;
 - 3.5. Distúrbios de hipoventilação alveolar;
 - 3.6. Exposição crônica a grandes altitudes;
 - 3.7. Anomalias do desenvolvimento pulmonar.
-

4. Hipertensão pulmonar tromboembólica crônica

5. Hipertensão pulmonar com mecanismos multifatoriais ou não esclarecidos

- 5.1. Distúrbios hematológicos: Anemia hemolítica crônica, doenças reumáticas, esplenectomia
- 5.2. Doenças sistêmicas: sarcoidose, histiocitose de células de Langerhans: limfangioleiomiomatose, vasculite.
- 5.3. Distúrbios metabólicos: doença de armazenamento de glicogênio, doença de Gaucher, distúrbios da tireoide.
- 5.4. Outros: obstrução tumoral, mediastinite fibrosante, insuficiência renal crônica em diálise, hipertensão pulmonar segmentar.

O **grupo 1** corresponde à HAP, que engloba HAP idiopática, HAP familiar associada com a mutação no gene *BMPR2*, que codifica o receptor da proteína morfogenética óssea tipo 2, hipertensão portal, vírus da imunodeficiência humana (HIV), doenças do tecido conjuntivo, doença cardíaca congênita e esquistossomose. O **grupo 2** envolve a Hipertensão Pulmonar Venosa (HPV), decorrente esta da pressão atrial esquerda cronicamente elevada em consequência de uma doença do coração esquerdo. O **grupo 3** refere-se à HP devida a doença pulmonar ou hipoxemia. Esse

grupo é mais comumente visto no contexto da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doença pulmonar intersticial (DPI) e distúrbio respiratório do sono (DRS). Nesse grupo, a frequência de HP nos portadores de DPOC, ultrapassa os 50%. O **grupo 4** engloba a hipertensão pulmonar tromboembólica crônica (HPTC), ou seja, representa a HP decorrente de eventos tromboembólicos pulmonares crônicos. O **grupo 5** compreende a HP associada aos mecanismos multifatoriais, onde existem causas diversas de HP, com a patogênese ainda obscura. Alguns exemplos que se enquadram nessa categoria são os distúrbios da tireoide, doença de armazenamento de glicogênio, doença de sarcoidose pulmonar (SIMONNEAU et al., 2013).

1.1.1 Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP)

Como citado acima, o grupo 1 corresponde à Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP), que é uma condição clínica progressiva e grave que afeta inicialmente as pequenas arteríolas pulmonares (GALIÉ; PALAZINNI; MANES, 2010; LAI et al., 2014). Ainda que sua etiologia permaneça obscura, supõe-se que a interação entre a pré-disposição genética e fatores de riscos ambientais possam estar envolvidos (CHIN e RUBIN, 2008). Nas fases iniciais, a doença é assintomática sendo que, as mudanças e sintomas que limitam a capacidade ao exercício físico aparecem geralmente quando as lesões promovidas pela HAP estão totalmente desenvolvidas. A estimativa da doença é de 10 a 52 casos por milhão (JANSA et al., 2014), com a incidência de 2,4 novos casos por ano para cada milhão de habitantes (VENTETUOLO et al., 2012).

De acordo com os achados na literatura, a sobrevivência dos pacientes com HAP que utilizam tratamentos farmacológicos, é de aproximadamente 7 anos, enquanto que os pacientes que não fazem uso desses fármacos, apresentam uma sobrevida bem inferior, de 2,8 anos (McGOON et al., 2013). Informações mais recentes, por sua vez, demonstram que a sobrevida dos pacientes com HAP gira em torno de 55-65% em três anos (VAILLANCOURT et al., 2015). Um estudo brasileiro, realizado pelo Instituto do Coração, da Universidade de São Paulo, mostrou que a média de idade de pacientes diagnosticados com a doença gira em torno dos 46 anos, apresentando sobrevivência de 74% em três anos (ALVES et al, 2015).

A busca por uma melhor compreensão dos fatores que levam ao desenvolvimento da doença tem mostrado algumas características semelhantes nos tecidos pulmonares, tais como: disfunção endotelial, aumento do estresse oxidativo, proliferação celular, remodelamento vascular e trombose *in situ* (RABINOVICH, 1997; RUBIN, 1999; TABIMA; FRIZZELL; GLADWIN, 2012; SIMONNEAU et al., 2013). Todas essas modificações são perceptíveis nos mais diferentes tipos celulares, incluindo células endoteliais, células musculares lisas, fibroblastos, etc (BARRETO et al., 2005).

1.1.2 Função Endotelial e HAP

Normalmente a PAPm corresponde a um quinto da pressão arterial sistêmica (PAS), uma vez que a circulação pulmonar é marcada por apresentar um sistema de alta complacência e fluxo e, baixa pressão (CALLOU e RAMOS, 2009). As alterações decorrentes da HAP, porém, são responsáveis pela diminuição da complacência dos vasos da circulação pulmonar, pela diminuição do diâmetro luminal e pelo aumento da RVP, que associados, elevam a PAPm, que atinge valores igual ou superiores a 25 mmHg (RABINOVICH, 1997; ABE et al., 2004).

Ao longo de muitos anos, imaginou-se que o endotélio dos capilares era apenas uma camada única de células que servia para filtrar passivamente o sangue, permitindo a passagem de água e outras moléculas pequenas, retendo macromoléculas e células sanguíneas no compartimento vascular. Atualmente, no entanto, o endotélio é conhecido por suas múltiplas funções consideradas essenciais para a manutenção da homeostasia vascular (AGGARWAL et al., 2013). Dentre essas funções destaca-se, a produção de substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras, que num estado normal mantêm-se equilibradas (DINH-XUAN, 1992). Em condições normais, a vasoconstrição é um mecanismo adaptativo e necessário, com a finalidade de equilibrar a ventilação e a perfusão, restringindo o fluxo sanguíneo em áreas pouco ventiladas em favor de áreas de melhor ventilação (BARRETO et al., 2005). No entanto, na HAP ocorre aumento da liberação de substâncias vasoconstritoras (como endotelina-1 (ET-1), angiotensina-II (Ang-II) e tromboxano A₂) e uma diminuição da liberação de substâncias vasodilatadoras (como óxido nítrico (NO) e prostaciclina), que resultam em constrição vascular sustentada (GALIÈ et al., 1996; TUDER et al., 1999; AGGARWAL et al.,

2013). Nesse aumento da vasoconstrição estão implicados os seguintes mecanismos: a) diminuição na liberação de agentes vasodilatadores; b) queda na sensibilidade do músculo liso aos fatores vasodilatadores; c) disfunção na via de transdução desses fatores e d) aumento na expressão e síntese dos agentes vasoconstritores (GIAID e SALEH, 1995).

Essa vasoconstrição persistente, clássica da doença, pode ser percebida em sintomas como a dispneia e a intolerância ao exercício (WEINSTEIN et al., 2013), frequentes dos pacientes, que ocorrem devido à dificuldade nas trocas gasosas associadas a um desequilíbrio na relação ventilação/perfusão, assim como a um reduzido retorno venoso e débito cardíaco (GROEPENHOFF et al., 2013). Consequentemente, percebe-se que todas essas modificações decorrem de uma disfunção endotelial prévia.

A disfunção endotelial caracteriza-se por apresentar aumento na síntese e liberação de fatores constritores derivados do endotélio e diminuição da síntese ou liberação de fatores relaxantes, como apresentado na figura 1. O resultado efetivo é aumento da vasoconstrição e diminuição da vasodilatação.

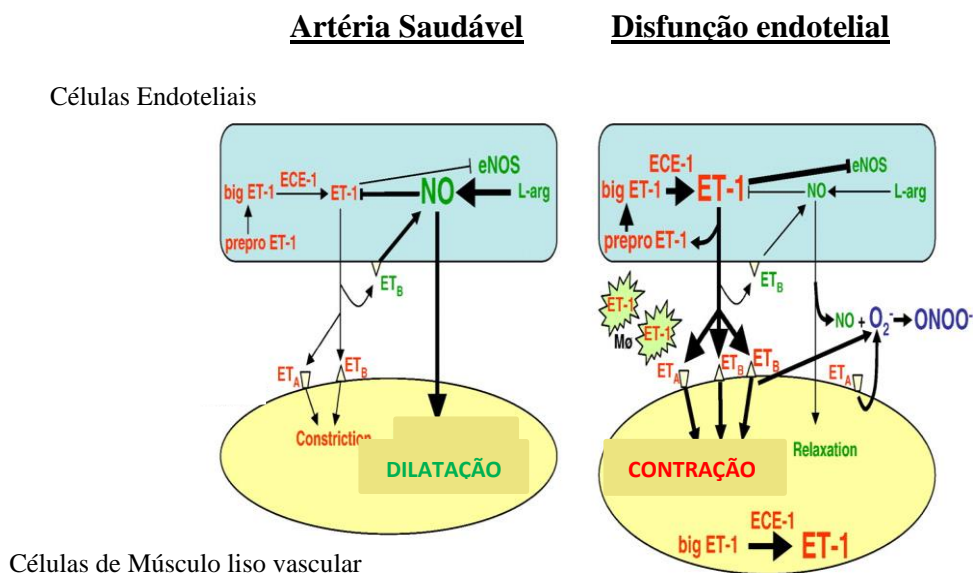


Figura 1. Artéria saudável e na disfunção endotelial. Big ET-1: big-ET-1; ECE-1: enzima conversora de endotelina-1. eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; L-arg: L-arginina; O₂⁻: radical superóxido; ONOO⁻: peroxinitrito.

Dentre as substâncias mais importantes para a manutenção do tônus vascular fisiológico, encontram-se a ET-1 e o NO, que são, respectivamente, o maior vasoconstritor e vasodilator derivados do endotélio (RODMAN e VOELKEL, 1997). Cada vez mais, tem-se visto que alterações no metabolismo dessas substâncias estão relacionadas diretamente com casos clínicos patológicos, como é o caso da patogênese da HAP (BARRETO et al., 2005; AGGARWAL et al., 2013; LAI et al., 2014).

O NO é um gás inorgânico, radical livre, com meia vida muito curta e ampla capacidade de difusão pelas membranas plasmáticas devido a suas características lipofílicas. Em função da sua estrutura química, o elétron desemparelhado confere reatividade com outras moléculas, o que leva a inúmeros e diferentes efeitos fisiológicos e patológicos (IGNARRO e LUN, 2001; MONCADA e HIGGS, 2006; HUYNH e CHIN-DUSTIN, 2006). O NO endógeno é formado a partir do aminoácido L-arginina, por meio de uma reação catalisada por uma família de enzimas, as óxido nítrico sintases (NOS) (DIAS-JUNIOR et al., 2008). Em condições normais, a NOS recebe elétrons do fosfato do nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH) no seu domínio redutase e transfere-os para o domínio oxigenase, via transportadores redox flavina adenina dinucleótido (FAD) e flavina mononucleótido (FMN). Uma vez no domínio oxigenase, os elétrons interagem com o ferro do grupo heme e com a 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH₄), co-fator importante para catalisar a reação do oxigênio com a L-arginina, produzindo L-citrulina e NO (GROSS, 1997; YOKOYAMA e HIRATA, 2007; KATUSIC et al., 2009). A figura 2 representa o processo de biossíntese do NO numa célula endotelial.

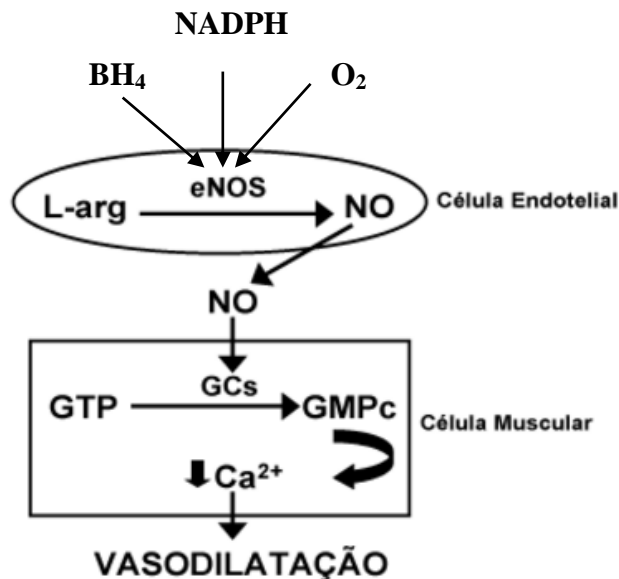


Figura 2. Processo básico da síntese de NO. BH₄: 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina. NADPH: fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo. GTP: trifosfato de guanosina. GCs: guanilato ciclase solúvel. GMPC: monofosfato de guanosina cíclico. Ca²⁺: cálcio. (Retirado e adaptado de Zago e Zanesco, 2006).

A família da NOS corresponde três isoformas, óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (GROSS, 1997; LANE e GROSS, 1999; RIBEIRO et al., 2001). As isoformas eNOS e nNOS são constitutivas, reguladas por íons cálcio e calmodulina e a liberação de NO ocorre em pequenas quantidades, com picos de curta duração (GROSS, 1997; LANE e GROSS, 1999; RIBEIRO et al., 2001). A isoforma iNOS é expressa sob condições não normais, sendo induzida por estímulos inflamatórios e apresenta a capacidade de sintetizar e liberar quantidades maiores de NO que a eNOS, sendo esta produção contínua até esgotar o substrato ou os cofatores necessários para síntese desse gás (GROSS, 1997). Assim, a iNOS, diferente das demais isoformas, pode manter e produzir elevados níveis de NO. O NO resultante possui atividade citotóxica (LANDINO et al., 1996).

Efeitos fisiológicos de manutenção do tônus vascular e da homeostasia, controlados pelo NO foram percebidos a partir da realização de inúmeros trabalhos, mostrando que a) a inibição da NOS diminui drasticamente a vasodilatação dependente do endotélio; b) a administração aguda de inibidores da NOS pode produzir vasoconstrição; c) camundongos nocautes para eNOS apresentam pressões arteriais mais elevadas (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Esse efeito de relaxamento da

musculatura lisa gerado pelo NO, envolve a estimulação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), que ativada converte trifosfato de guanosina (GTP) em GMPc (monofosfato de guanosina cíclico) (FURCHGOTT e ZAWADZIKI, 1980; MONCADA e HIGGS, 2006). Este, por sua vez, estimula a quinase dependente de GMPc (PKG), que pode ativar canais de potássio (K^+) induzindo hiperpolarização ou estimular a saída de cálcio (Ca^{2+}) do citoplasma, o que causa vasodilatação (RAPOPORT e MURAD, 1983; WEB, 2003).

Além dessa importante função, o NO participa também de muitas outras reações biologicamente importantes. Tem a capacidade de inibir processos como a agregação plaquetária, adesão de leucócitos ao endotélio e a produção de endotelinas (MONCADA e HIGGS, 2006). No sistema imune, os macrófagos, que fagocitam as células cancerígenas e corpos estranhos, são estimulados a produzir grandes concentrações de NO (GROSS, 1997). O NO reage também, com o oxigênio molecular (O_2), com o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ou com metais de transição (M) produzindo espécies reativas de nitrogênio (RNS), tais como o trióxido de dinitrogênio (N_2O_3), o dióxido de nitrogênio (NO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-), peroxinitrito ($ONOO^-$), e adutos metanitrosil (TABIMA; FRIZZELL; GLADWIN, 2012). Percebe-se dessa forma, que a amplitude de atuação do NO é bastante extensa e, parte disso, deve-se ao fato de que praticamente todas as células do corpo o produzem.

Uma isoforma muito importante na regulação da produção do NO é a eNOS (RODMAN e VOELKEL, 1997; PARVIZ et al., 1999). Tanto em modelos clínicos, quanto em pré-clínicos de HAP, há uma controvérsia sobre a expressão da enzima eNOS no leito pulmonar, uma vez que já foram encontrados níveis aumentados (XUE et al., 1995), diminuídos (GIAID e SALEH, 1995) ou ainda, inalterados (TUDER et al., 1999). Essas diferenças podem, parcialmente, ser explicadas pelas diferenças nas janelas temporais que foram analisadas, bem como no fato de que em modelos animais, as medidas normalmente são realizadas durante a progressão da doença, enquanto em tecidos humanos, foram realizadas em casos finais da doença ou, mesmo, após a morte dos pacientes.

Embora a concentração de eNOS pulmonar ainda seja algo controverso, uma redução na sinalização e liberação do NO é consistentemente relatada em modelos pré-clínicos e em pacientes com HAP (FAGAN et al., 1999; STORME et al., 1999; BUDHIRAJA et al., 2004; XU et al., 2004; OZTURK e UMA, 2010). Esses fatores

associados, podem, em parte, ser explicados pelo processo denominado “desacoplamento da eNOS”. Nessa situação, a eNOS não catalisa a oxidação de L-arginina a NO. Mesmo assim, ela é capaz de receber e estocar elétrons no seu domínio redutase, doando-os um a um ao seu substrato oxigênio. Consequentemente, em seu estado desacoplado, a eNOS gera $O_2^{\cdot-}$ ao invés de NO (FÉLÉTOU e VANHOUTTE, 2006; SCHULZ et al., 2008). Também é possível que a eNOS fique parcialmente desacoplada, produzindo simultaneamente o NO e o $O_2^{\cdot-}$, que podem interagir entre si e gerar $ONOO^-$, aumentando drasticamente o dano oxidativo (BECKMAN e KOPPENOL, 1996; FÖRSTERMANN e MÜNZEL, 2006; CRABTREE et al., 2008) e agravando a disfunção endotelial, uma vez que essa espécie reativa é fortemente nitrosilante e nitrante podendo reagir com as tirosinas livres ou ligadas à proteínas e conduzir para a HAP. Da reação do $ONOO^-$ com tirosinas livres ou ligadas, resulta a formação de nitrotirosina, cuja mensuração em tecidos é considerada um marcador da formação de $ONOO^-$, por ter sua concentração estável (HENSLEY; WILLIAMSON; FLOYD, 2000; VASCONCELOS et al., 2007).

Dessa forma, uma menor disponibilidade de NO e uma maior formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, evidências clássicas da doença, devido à disfunção endotelial e ao estresse oxidativo elevado, levam a progressão e a piora no prognóstico dos pacientes, uma vez que devido a redução da ação do NO, a vasodilatação se torna prejudicada. A partir dessa menor vasodilatação, os pacientes tornam-se incapazes de realizar tarefas e atividades simples do dia a dia, como subir um lote de escadas, uma vez que sintomas como a intolerância a exercícios se torna mais evidente.

Além de mediar a vasodilatação, o endotélio é uma fonte importante de fatores vasoconstritores. Yanagisawa e colaboradores (1988), ao trabalharem com células vasculares endoteliais aórticas de porcos, identificaram um potente fator constritor derivado do endotélio, que passou a ser chamado de endotelina (ET), capaz de mediar efeito de vasoconstrição lento, mas de longa duração, podendo atingir em minutos ou horas (PARRIS E WEBB, 1996; HAYNES E WEBB, 1998). As ETs correspondem a uma família de três peptídeos, contendo 21 aminoácidos (aa), que podem ser formadas por várias células (YANAGISAWA et al., 1988).

A ET-1 é o principal e mais potente vasoconstritor derivado do endotélio, tanto em vasos de grande calibre, quanto em vasos de menor calibre ou da microcirculação.

Também é a isoforma mais abundante e potente no tecido pulmonar e cardiovascular (OHKITA et al., 2012), sendo produzida principalmente em células endoteliais, mas também em células da musculatura lisa vascular, fibroblastos, macrófagos, cardiomiócitos e neurônios. Sua síntese ocorre pela transcrição gênica, da pré-pró-ET-1. Assim esse precursor de 212 aa inativo é clivado por endopeptidases específicas, que o convertem em pró-ET-1. A pró-ET-1 sofre proteólise, gerando uma forma biologicamente inativa, a *big*-ET-1, composta de 39 aa. Essa ação ocorre predominantemente no plasma e não no interior das células endoteliais (SUZUKI et al., 1989). Porém, já foram detectadas concentrações de ET-1 no citoplasma de células endoteliais humanas, inferindo assim, que parte desta conversão ocorre no citoplasma (HOWARD; PLUMPTON; DAVENPORT, 1992).

A conversão da *big*-ET-1 em ET-1 ocorre pela ação da enzima conversora de endotelina (ECE), que a cliva e gera a forma ativa desse peptídeo, com 29 aa. As ECEs são metaloproteases de zinco que pertencem a superfamília de endopeptidases e consiste em duas isoformas, ECE-1 e ECE-2. A ECE-1 está ligada a membrana e é expressa numa variedade de células, principalmente nas células endoteliais, sendo esta a isoforma reguladora do sistema cardiovascular (XU et al., 1994). A ECE-2, por sua vez, é uma enzima de processamento intracelular que funciona em condições ácidas, sendo expressa principalmente em neurônios (EMOTO e YANAGISAWA, 1995). A conversão final para produção de ET-1 é extremamente importante devido à potência vasoconstritora de 140 vezes superior da ET-1 em relação ao efeito da *big*-ET-1 (RUBANYI e POLOKOFF, 1994). Dentre os principais estímulos para sua síntese e secreção encontram-se Ang-II, fator de crescimento tumoral β (TGF β), hipóxia, tensão de cisalhamento, trombinas, citocinas (Interleucina- 1 (IL-1)), fluxo, entre outros (GIANNESI et al., 2001; STOW et al., 2011; HORINOUCI et al., 2013); enquanto que os principais inibidores incluem as prostaciclina, NO, peptídeo natriurético atrial (PNA), heparina e outros (GIANNESI et al., 2001; STOW et al., 2011; HORINOUCI et al., 2013). Os principais fatores estimuladores e inibidores da síntese e secreção da ET-1 estão apresentados na figura 3.

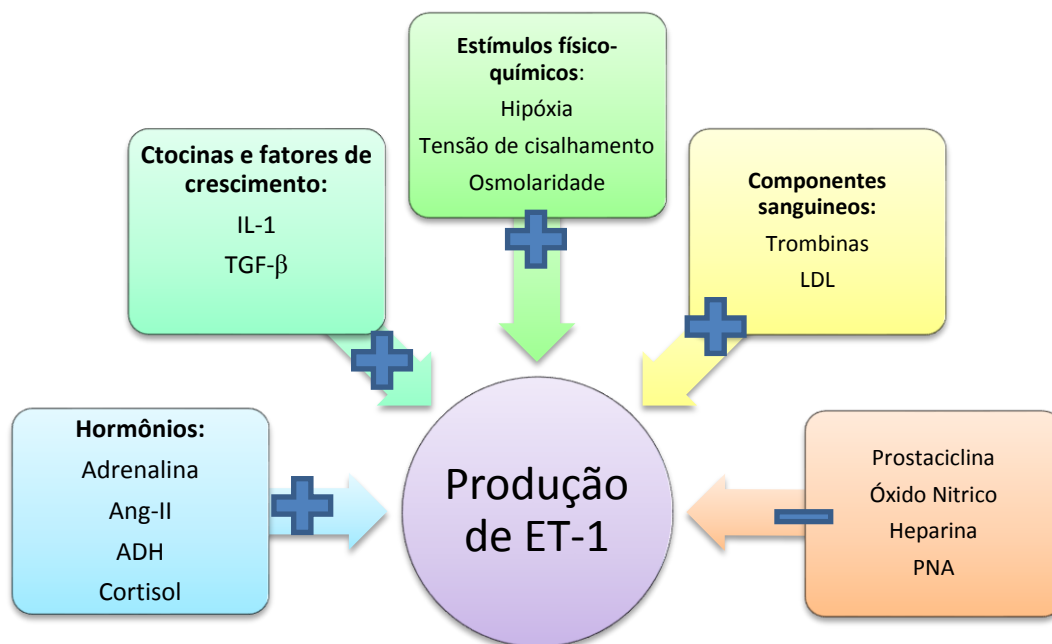


Figura 3. Principais fatores estimuladores e inibidores da síntese de ET-1. Ang-II: angiotensina-II; ADH: hormônio antidiurético; IL-1: interleucina-1; TGF- β : fator de crescimento tumoral β . PNA: peptídeo natriurético atrial. (Retirado e adaptado de Horinouchi et al., 2013).

A ET-1 é secretada principalmente na direção subluminal da célula podendo atuar de forma autócrina ou parácrina, nas células de músculo liso, células do miocárdio e células do tecido conjuntivo. Devido a esse tipo de ação, a concentração local de ET-1 é 100 vezes mais elevada do que no nível plasmático, onde é rapidamente eliminada da circulação. Dentre os principais efeitos da ET-1, estão a ação vasopressora, efeito inotrópico (ISHIKAWA, 1988) e cronotrópico positivo (ISHIKAWA et al., 1988) e o efeito proliferativo (BARTON e YANAGISAWA, 2008). Essas ações são mediadas através da ligação do peptídeo ET-1 com dois receptores (ET-A e ET-B), que são receptores acoplados à família das proteínas G (ALEXANDER et al., 2011) (figura 4). O receptor ET-A tem 10 vezes mais afinidade pela ET-1 do que para as outras isoformas das ETs (YANAGYSAWA et al., 1988; BARTON e YANAGISAWA, 2008). Esse receptor é altamente expresso em células da musculatura lisa, sendo que a formação do complexo ET-1 com ET-A contribui e estimula a proliferação e contração dessas células. Essa ação que decorre da ligação da ET-1 no seu receptor ET-A gera aumento no cálcio intracelular que conduz a fosforilação e ativação da cadeia leve de miosina, provocando contração celular e vasoconstrição potente (WIRTH et al., 2008).

O receptor ET-B, por sua vez, é encontrado principalmente em células endoteliais (OGAWA et al., 1991), mas também em concentrações menores nas células de músculo liso vascular e fibroblastos. Possui a mesma afinidade para as três isoformas das ETs (YANAGYSAWA et al., 1988; BARTON e YANAGISAWA, 2008). Nas células endoteliais a ativação desse receptor pela ET-1, gera efeito vasodilatador por estimular a síntese e liberação de NO e prostaciclina (LIU et al., 2003; THORIN e WEBB, 2010). O NO gerado a partir dessa situação inibe a proliferação das células musculares lisas (EGUCHI et al., 1993). A ligação da ET-1 com o receptor ET-B também exerce efeito de depuração da ET-1 da circulação (DE NUCCI et al., 1988; FUKURODA et al., 1994; DUPUIS et al., 1996). Esse efeito é rápido e, é extremamente importante para manutenção dos níveis normais da ET-1 (FUKURODA et al., 1994; DUPUIS et al., 1996). Em pulmões de ratos normais, encontrou-se cinco vezes mais RNA mensageiro do gene pré-pró-ET-1, do que em qualquer outro órgão, sendo este responsável pela metabolização de primeira passagem (80-90%) desse peptídeo (MATSUMOTO et al., 1998).

Cabe salientar, porém, que quando a ET-1 liga-se no receptor ET-B, localizado nas células de músculo liso vascular, exerce um efeito de vasoconstrição. Patologicamente, a ligação da ET-1 se dá principalmente nas células musculares lisas e, conseqüentemente, promove vasoconstrição (CHESTER et al., 1989). A figura 4 resume as diferentes ações promovidas pela ET-1, evidenciando os variados efeitos de acordo com o receptor e o tipo de célula em que ocorre essa interação.

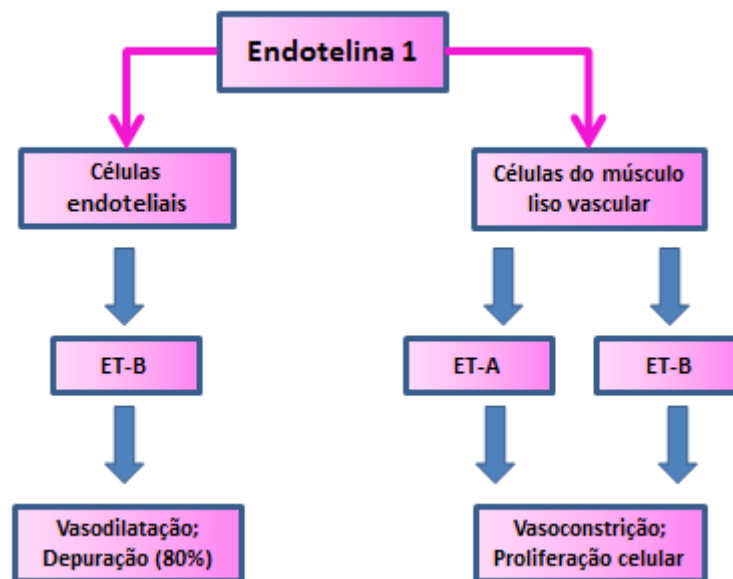


Figura 4. Resumo das ações da ET-1 mediada por receptores acoplados a proteína G. Nas células endoteliais, a ligação da ET-1 com receptores ET-B resulta em vasodilatação. Efeito oposto ocorre na ligação entre ET-1 e seus receptores (ET-B e ET-A) nas células musculares lisas, uma vez que promove potente vasoconstrição e proliferação celular.

De uma forma geral, a transdução dos receptores ET-A e ET-B envolve a ativação da fosfolipase C (PLC), a geração de 1,4,5 trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG) e a mobilização de Ca²⁺ (ASSENDER; IRENIUS; FREDHOLM, 1996; MONTANI et al., 2014).

Há vários estudos que apontam para modificações nos níveis de ET-1 na HAP e que estas estão diretamente relacionadas com o prognóstico do paciente (STWEART et al., 1991; GIAID et al., 1993; RUBENS et al., 2001). Tanto em estudos clínicos quanto em estudos pré-clínicos foram encontrados aumentos na concentração de ET-1 (STWEART et al., 1991; GIAID et al., 1993; FRASCH; MARSHALL; MARSHALL, 1999; RUBENS et al., 2001) decorrente de uma menor metabolização do peptídeo, de uma maior síntese celular ou ainda de ambos, bem como alteração na densidade e na ligação da ET-1 com seus receptores (TABIMA; FRIZZELL; GLADWIN, 2012). Normalmente, essas modificações no metabolismo da ET-1 estão intimamente relacionadas com as modificações estruturais e funcionais promovidas pela doença no leito pulmonar.

É interessante notar que, qualquer alteração no metabolismo de um dos fatores derivados do endotélio (NO e ET-1), promove consequentemente modificação no outro e vice-versa, por isso o controle nas funções endoteliais é realizado de forma precisa. Diversos estudos, demonstraram a existência de um mecanismo de feedback entre a ET-1 e o NO (OZAKI et al., 2001; WEDGWOOD et al., 2005; DAI et al., 2006). Por exemplo, a ativação dos receptores ET-B pela ET-1, nas células endoteliais, estimula a enzima eNOS a produzir e secretar mais NO. O NO por sua vez atua ativando o GMPc e inibe a secreção da ET-1, reduzindo seus efeitos (REDMOND et al., 1996; BOULLANGER e LÜSCHER, 1990).

1.1.3 Estresse Oxidativo e HAP

Associado a esses dados (menor disponibilidade de NO e maior de ET-1), há uma elevação na formação de espécies reativas, que conduzem para o aumento do estresse oxidativo na HAP (GROBE et al., 2006; TABIMA; FRIZZELL; GLADWIN, 2012; LAI et al., 2014). O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e de defesas antioxidantes, em favor dos primeiros, ou em decorrência da diminuição dos segundos (LEE; GIORDANO; ZHANG, 2012). Estudos recentes apontam que o estresse oxidativo é um potente mediador da HP e das mudanças patológicas associadas à vasculatura pulmonar e ao VD (DEMARCO et al., 2010).

A terminologia espécies reativas de oxigênio abrange espécies radicalares e que, embora não possuam elétrons desemparelhados, são muito ativas em decorrência da sua instabilidade. As espécies reativas de oxigênio incluem uma variedade de espécies, tais como: oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$), radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^\cdot) (AFANAS'EV, 2011; POLJSKAK, 2011). Cada uma delas possui características específicas, com reatividades e tempos de meia-vida diferentes (YU, 1994). As espécies reativas de oxigênio podem ser produzidas em quase todos os tipos celulares, incluindo as células endoteliais, as células de músculo liso, os cardiomiócitos e as células da musculatura esquelética. A figura 5 representa a formação de espécies reativas de oxigênio na cadeia de transporte de elétrons.

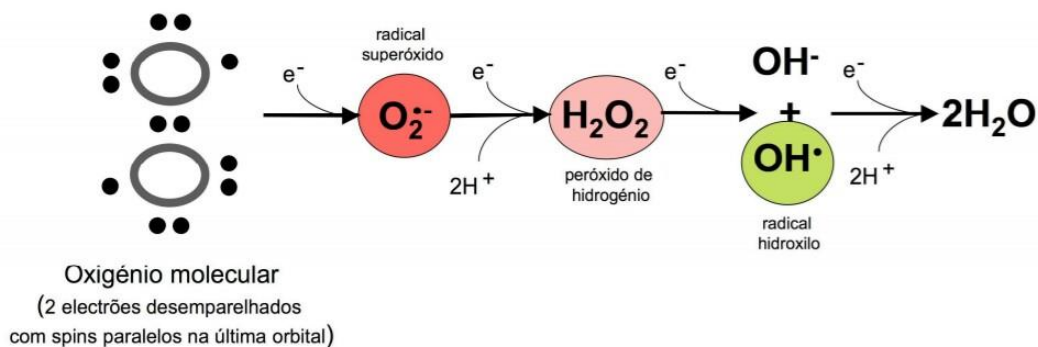


Figura 5. Distribuição dos elétrons na orbital externa da molécula de oxigênio e redução da molécula de água, justificando a formação de espécies reativas de oxigênio na cadeia de transporte de elétrons (Retirado e adaptado de Ferreira et al., 2007).

Como possuem reatividade e instabilidade, as espécies reativas de oxigênio interagem com outras moléculas biológicas e, conseqüentemente, podem exercer efeitos prejudiciais, quando em altas concentrações, a proteínas, carboidratos e lipídios da membrana e do ácido desoxirribonucleico (DNA) (HALLIWELL 1999; TRACHOOTHAM et al., 2008; TABIMA; FRIZZELL; GLADWIN, 2012; LUSHCHAK et al., 2014). Porém, depois da descoberta de que as ações das espécies reativas de oxigênio variavam de acordo com a sua concentração, houve redefinição do termo estado redox. Percebeu-se que, em concentrações normais, as espécies reativas estão relacionadas com a sinalização celular, defesa do organismo contra xenobióticos e desencadeamento de eventos redox-sensíveis (proliferação, adesão e sobrevivência celular) (TSUTSUI et al., 2009; SAMJOO et al., 2013).

São inúmeras as fontes envolvidas na produção de espécies reativas de oxigênio no quadro clínico da HAP, dentre elas a NADPH Oxidase (NOX), xantina oxidase (XO) e eNOS desacoplada ganham grande relevância. Uma das enzimas mais importante na patogênese da HAP é a NOX, uma enzima associada à membrana plasmática que catalisa a redução univalente do O_2 a $O_2^{\cdot-}$, usando o NADH ou o NADPH como doador de elétrons. As isoformas da NOX não são apenas as principais geradoras de $O_2^{\cdot-}$ na vasculatura pulmonar durante a HAP, mas também regulam a atividade de outras oxidases geradoras de espécies reativas, tais como as XO (RUECKSCHLOSS et al., 2001; TABIMA; FRIZZELL; GLADWIN, 2012; LAI et al., 2014). O $O_2^{\cdot-}$ derivado da ação da NOX desempenha um papel chave na disfunção endotelial, onde tem sido

associado com uma diminuição na produção e secreção de prostaciclina e, um aumento nos níveis de secreção tromboxano A_2 em modelo animal de HAP induzido por monocrotalina (MCT) (SETA et al., 2011). As espécies reativas de oxigênio também podem estabelecer uma relação com a ET-1, uma vez que podem modular ou sofrer modulação pela ET-1. Por exemplo, dados evidenciaram que o estresse oxidativo aumentado estimula a síntese de pré-pró-ET-1 e aumenta a secreção da ET-1 na HAP induzida pela MCT (STEWART et al., 1991; CHENG et al., 2001), enquanto que o aumento da ligação da ET-1 ao seu receptor ET-A nas células musculares lisas durante a HAP, gera uma elevação na produção de $O_2^{\cdot-}$, que culmina em um aumento na proliferação celular, inibição das NOS e vasoconstrição, desempenhando papel significativo na piora da disfunção endotelial e na progressão da doença (AGGARWAL et al., 2013).

As espécies reativas de oxigênio podem ainda ser geradas na própria mitocôndria (TABIMA; FRIZZELL; GLADWIN, 2012; LAI et al., 2014). Os processos de oxidação exercidos pelas mitocôndrias são rigidamente controlados por sinais extracelulares e intracelulares, em condições fisiológicas normais e são fundamentais para a regulação de diversos processos celulares, tal como a sobrevivência celular (MURPHY et al., 2011). Porém, na presença de disfunção mitocondrial, como ocorre na HAP, há uma elevação na produção das espécies reativas de oxigênio que estão associadas ao remodelamento vascular pulmonar através do aumento de cálcio intracelular e contração das células musculares lisas (VENDITTI et al., 2004; BARCLAY et al., 2005; AGGARWAL et al., 2013).

As espécies reativas de nitrogênio também são produtos altamente reativos e, estão implicadas na patogênese da HAP (TABIMA; FRIZZELL; GLADWIN, 2012). Como citado anteriormente, durante a progressão da doença ocorre a formação, por exemplo, de $ONOO^{\cdot-}$, por interação do $O_2^{\cdot-}$ com o NO. O $ONOO^{\cdot-}$ pode interagir fortemente com biomoléculas, podendo provocar toxicidade e morte celular, tanto das células endoteliais, quanto das células musculares lisas. Estudos mostraram também, que o $ONOO^{\cdot-}$ pode inibir irreversivelmente a atividade da eNOS *in vitro* (WEDGWOOD et al., 2001) e aumentar os níveis da enzima eNOS nitrosada *in vivo* (CHENG et al., 2001), ambos estados disfuncionais da enzima eNOS que não promovem a síntese normal de NO, contribuindo para redução da sua disponibilidade.

Na tentativa de minimizar ou até mesmo inibir os efeitos deletérios dessas espécies, o organismo possui um sistema de defesa antioxidante complexo e bastante eficiente (SIES, 1991). De acordo com Halliwell (2000) “antioxidante é qualquer substância que quando presente em baixa concentração comparada a do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente sua oxidação”. Os mecanismos de ação dos antioxidantes envolvem a redução da produção de espécies reativas, remoção dessas moléculas presentes no meio, impedimento da propagação do dano promovido por essas espécies, quelação dos metais que catalisam a formação das espécies reativas e, ainda, indução de aumento na geração de antioxidantes endógenos (YU, 1994). Na maioria das vezes, ocorre uma integração de vários destes componentes. Os principais antioxidantes enzimáticos vasculares são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (McCORD e FRIDOVICH, 1969) e os principais antioxidantes não-enzimáticos são glutathione reduzida (GSH), os tocoferóis, vitamina C (ácido ascórbico), β -caroteno, bilirrubina, entre outros (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000; DRÖGE, 2002). Assim, as enzimas antioxidantes desempenham um papel crítico na regulação dos níveis de oxidantes na vasculatura e a sua desregulação tem sido implicada na patologia da HAP.

1.1.4 Remodelamento Vascular e Cardíaco na HAP

Todas essas alterações endoteliais, bioquímicas e morfofuncionais citadas anteriormente causam vasoconstrição sustentada (BOOGARD et al., 2009), aumento da espessura da camada muscular lisa (túnica média), remodelamento da membrana basal (camada adventícia) de pequenas artérias e das arteríolas pulmonares (RUNO e LOYD, 2003; NEWBY, 2006), que promovem elevação progressiva da velocidade de fluxo sanguíneo, aumento do tônus vascular e da RVP e, que, somadas, culminam em aumento da PAPm (figura 6), levando ao aumento da pós-carga imposta ao VD (figura 7).

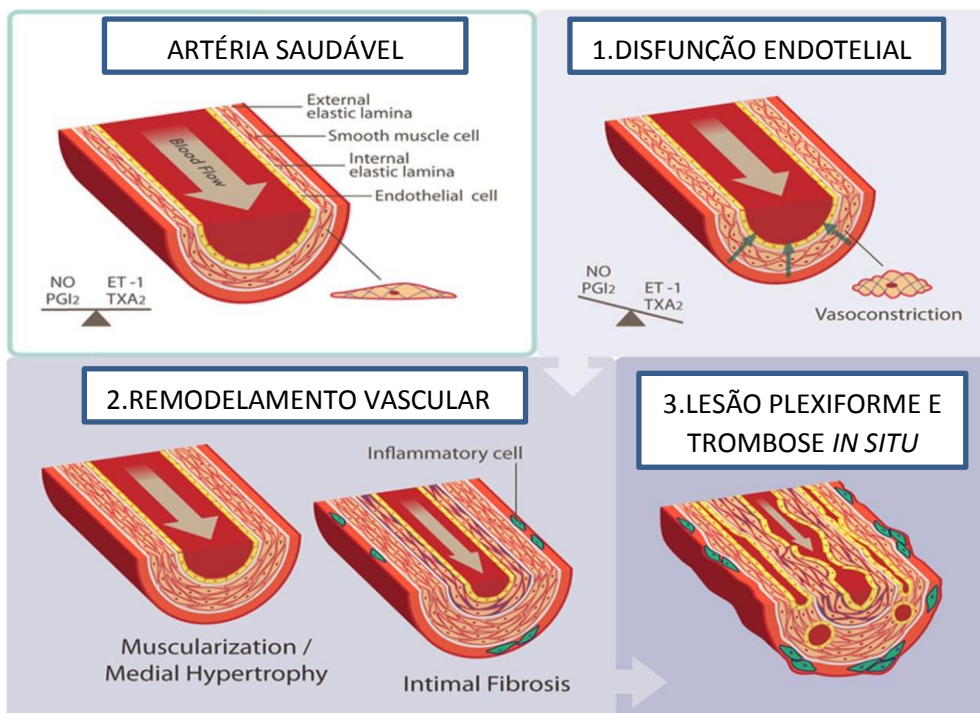


Figura 6. Alterações celulares na HAP. Artéria saudável, com a manutenção dos fatores derivados do endotélio em equilíbrio, bem como todas as camadas do vaso bem definidas. Na HAP, porém, sugere-se que um estímulo inflamatório inicial desencadeie a disfunção endotelial, seguida por vasoconstrição sustentada, remodelamento vascular, formação de lesões plexiformes e trombose *in situ*. (Retirado e adaptado de LAI et al., 2014).

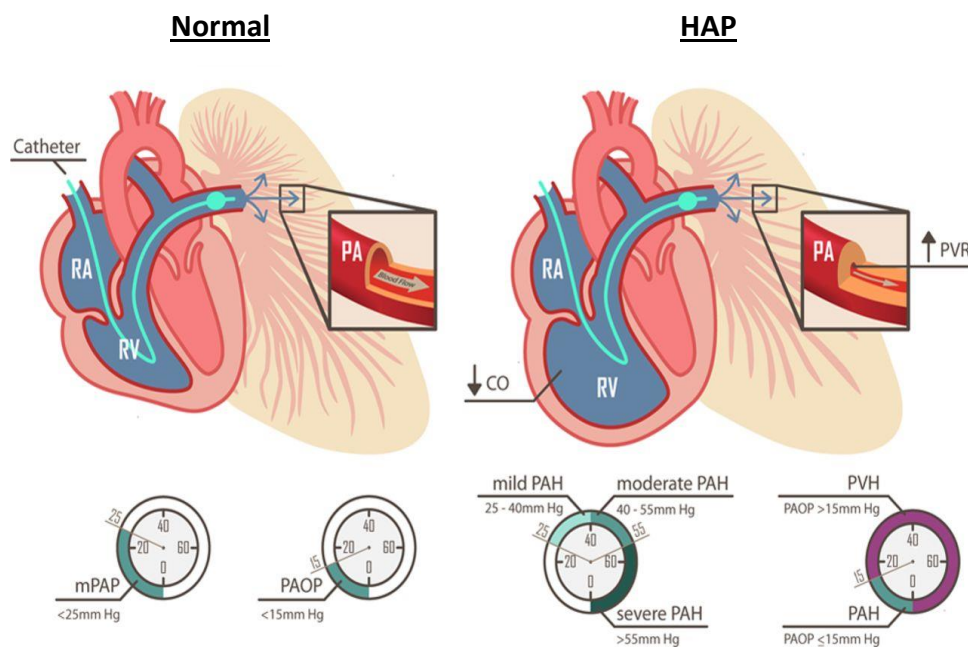


Figura 7. Progressão da HAP e desenvolvimento da ICD. As alterações na vasculatura pulmonar, elevam o fluxo sanguíneo, a RVP e a PAPm, impondo uma pós-carga ao VD maior. Esse aumento na pós-carga promove alterações funcionais e estruturais no VD,

que culminam para hipertrofia, dilatação e ICD. (Retirado e adaptado de LAI et al., 2014).

É bem estabelecido que o VD tolera melhor a sobrecarga de volume, ao invés de pressão. Quando há aumento da pós-carga, devido ao aumento da resistência pulmonar, o VD precisa se adaptar, alterando a sua morfologia, sua massa muscular e sua perfusão (que passa a ser bifásica) (BOOGARD et al., 2009). A dilatação do VD pode ainda gerar modificações na complacência do ventrículo esquerdo (VE) pela retificação do septo interventricular. Estas modificações ocorrem de acordo com o tipo de sobrecarga (aguda ou crônica) imposta aos ventrículos. O estímulo patológico causado pela sobrecarga de pressão (como acontece na HAP) produz um aumento no estresse de parede, e esse fator, conseqüentemente, resulta numa hipertrofia cardíaca concêntrica (LAI et al., 2014). À medida que a pós-carga aumenta, o VD entra em processo de falência e o débito cardíaco (DC) começa a declinar. O estado em que a ICD se estabelece é conhecido como *Cor pulmonale* (DALLA LIBERA et al., 1999; ENACHE et al., 2013). O *Cor pulmonale* é uma síndrome caracterizada pela hipertrofia do VD, resultante de doenças que afetam a função e/ou a estrutura dos pulmões, como é o caso da HAP. Estima-se que o *Cor pulmonale* corresponda a 6 a 7% de todos os tipos de doenças cardiovasculares em adultos (PORTAL DO CORAÇÃO, 2008). A sobrevida dos pacientes com HAP e *Cor pulmonale* é de 45% e, os pacientes que apresentam apenas a HAP demonstram de 69% de sobrevida em dois anos após o diagnóstico (MACNEE, 1992).

As alterações da fisiologia cardiorrespiratória apresentadas pelos pacientes com *Cor pulmonale*, tais como: falta de ar durante o exercício ou algum esforço, retenção de líquidos, edema de membros inferiores e pré-síncope/síncope são os desfechos responsáveis pela incapacidade ao exercício físico, e estão basicamente relacionados com o declínio da função do VD. A falência do VD é a principal causa de morte em pacientes com HAP, e a capacidade do VD em se adaptar ao aumento progressivo da RVP, associado com alterações na vasculatura pulmonar, são os principais determinantes da capacidade funcional e sobrevivência desses pacientes (HADDAD et al., 2008; GALIÉ, PALAZZINI E MANES, 2010; LAI et al., 2014). Ou seja, enquanto o VD conseguir manter o débito cardíaco, apesar das alterações pulmonares provocadas pela doença, o paciente permanece pouco sintomático. Marcus et al., (2010) mostraram

que pacientes com HAP e disfunção grave do VD (fração de ejeção inferior que 35%), independente da RVP evidenciada na avaliação inicial, apresentaram menor taxa de sobrevida.

Dessa maneira, a incapacidade funcional que promove prejuízo na qualidade de vida dos pacientes com HAP está diretamente associada aos desarranjos nas variáveis hemodinâmicas (aumento da PAPm e diminuição do DC), ao aumento do estresse oxidativo e a disfunção endotelial.

Atualmente na clínica, para o tratamento da HAP, são utilizados fármacos como, por exemplo, o bosentan (antagonista competitivo da ET-1 e inibe a sua ligação com os seus receptores) e o sildenafil (um inibidor da enzima fosfodiesterase 5) (CHEN et al., 1995; CORBIN et al., 2005; MONTANI et al., 2014; LAI et al., 2014) que atuam na tentativa de minimizar os sintomas promovidos pela disfunção endotelial encontrados nesses pacientes. Porém, além do alto custo, a utilização desses fármacos provoca inúmeros efeitos colaterais. Dessa forma, estudos que busquem tratamentos que promovam manutenção da função do VD, da função endotelial, bem como que estimulem a produção de enzimas antioxidantes e a diminuição do estresse oxidativo seriam importantes ferramentas benéficas como tratamento adjuvante para pacientes com HAP. Dentre essas estratégias, podem ser citadas a utilização de antioxidantes exógenos (como vitamina E) e a prática regular de exercício físico, sendo este último uma proposta interessante por ser passível de baixo custo e de fácil acesso à população.

1.1.5 Exercício Físico e HAP

Como visto, em baixas concentrações, a formação das espécies reativas de oxigênio é um processo fundamental para uma resposta adaptativa celular, que pode promover a citoproteção. Entretanto, quando presentes em altas concentrações, as espécies reativas de oxigênio podem promover efeitos celulares patológicos. Esse conceito, onde as espécies reativas de oxigênio estimulam uma resposta celular adaptativa, quando em baixas concentrações, é conhecido como hormese (SAMJOO, et al., 2013). Segundo Calabrese e Baldwin (2002), hormese significa uma resposta adaptativa, caracterizada por um comportamento bifásico de dose-resposta, após a ruptura da homeostase. Um exemplo clássico de efeito hormético é influenciado pelo

exercício físico, que promove um acréscimo inicial de espécies reativas de oxigênio, mas que a longo prazo poderia resultar numa adaptação positiva, a qual é caracterizada por um efeito benéfico sobre o remodelamento e função cardíaca, ou ainda por elevação na concentração de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

É comum acreditar que, em muitos casos, principalmente naqueles mais graves de HAP, o exercício físico possa exercer um impacto negativo, aumentando o estresse de cisalhamento, o remodelamento pulmonar e agravando a ICD, contribuindo para uma elevação no risco de morte súbita (BADESCH et al, 2007). Atualmente, porém, o exercício físico tem sido sugerido como uma terapia não farmacológica eficaz para minimizar as alterações cardíacas e disfuncionais geradas pela HAP.

O exercício físico aeróbio constitui em uma atividade praticada com repetições sistemáticas de movimentos orientados, que gera aumento no consumo de oxigênio decorrente da maior sobrecarga imposta ao tecido muscular. A partir desse efeito inicial, promove múltiplas respostas fisiológicas adaptativas, especialmente, nos sistemas cardiovascular e respiratório, objetivando a manutenção da homeostasia (RADAK et al., 1999; MERELES et al., 2006). Além do baixo custo, a prática regular de exercício físico promove ativação de enzimas antioxidantes, angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos a partir dos pré-existentes) (PRIOR et al., 2003), aumento na capilarização (PORTER et al., 2002) e vasodilatação (TADDEI et al., 2000), através do estresse de cisalhamento, prolongando a meia-vida do NO e, reduzindo também a sua metabolização por radicais livres (FUKAI et al., 2000), ou através da redução direta da produção de espécies reativas (ADAMS et al., 2002).

Logo, a prática de exercício físico realizado de maneira adequada, supervisionada por profissionais especializados, pode contribuir como um tratamento não farmacológico para doenças cardiovasculares (DE SOUZA-RABBO, 2005). Estimativas sugerem que aproximadamente 12% do custo com doenças cardiovasculares pode ser atribuído à inatividade física, tornando estas um problema multibilionário (YUSUF et al., 2004).

Sabendo que o sedentarismo provoca atrofia muscular, capilaridade reduzida e diminuição da capacidade oxidativa (DAUSSIN et al., 2008) é dever salientar que essas alterações, em conjunto com à redução da capacidade respiratória mitocondrial são totalmente passíveis de apresentarem melhoras através da prática contínua de exercício

físico aeróbio. Porém, quando o assunto é a recomendação de exercício físico aeróbio como tratamento adjuvante no tratamento de HAP, percebe-se uma total inconsistência nos dados obtidos na literatura, dificultando uma possível aceitação dessa prática na clínica. Por exemplo, um estudo realizado em 2006, os pacientes com HAP e ICD que participaram de um programa de exercício físico, tiveram melhoras significativas na capacidade funcional, consumo máximo de O₂ e qualidade de vida (MERELES, et al., 2006). Outro estudo, que consistia de um protocolo de exercício físico realizado durante três semanas, em ambiente hospitalar, seguido de três meses de exercício físico em casa, com supervisão por telefone, percebeu-se que o exercício aeróbio não foi capaz de promover melhoras nos padrões hemodinâmicos cardíacos, mas foi eficaz em aprimorar significativamente a qualidade de vida dos pacientes com HAP (MONTANI et al., 2013). Estudo de 2015, porém, contraindicou a prática de exercício físico até para aqueles pacientes mais levemente afetados pela doença, devido a suas implicações na piora da função ventricular direita (ARENA et al., 2015). Os estudos citados acima demonstram a importância do desenvolvimento de novas pesquisas envolvendo o exercício físico aeróbio, na tentativa de esclarecer o seu real efeito sobre essa patologia.

Estudos clínicos e pré-clínicos avaliando o efeito do exercício físico aeróbio sobre o metabolismo do NO, na HAP, são bastante escassos. Alguns dados encontrados sobre as ações promovidas pelo exercício físico no metabolismo do NO demonstram variações, dependendo do tipo de treinamento, duração e, ainda, da presença ou ausência de patologia. Por exemplo: em um estudo com protocolo de treinamento com duração de quatro semanas, houve aumento dos níveis da eNOS em tecido aórtico de ratos (DELP; MCALLISTER; LAUGHLIN, 1993), enquanto que outro estudo, avaliando o efeito a longo prazo (16 semanas) de exercício, não encontrou alteração na expressão da eNOS em artérias pulmonares de porcos (JOHNSON e LAUGHLIN, 2000). O efeito do exercício físico sobre o metabolismo do NO em humanos também já foi estudado e, também sofre variações dependendo do tipo de treinamento, duração e presença/ausência de doenças. Em humanos saudáveis, por exemplo, a expressão e a atividade da enzima eNOS não foi alterada pelo treinamento. Porém, a resposta vasodilatadora foi melhorada em pacientes com insuficiência cardíaca crônica (ICC) que participaram de protocolo de treinamento (HAMBRECHT et al., 1998). Em relação aos efeitos promovidos pelo exercício físico sobre o metabolismo da ET-1, os dados são ainda mais escassos e também são influenciados pelo tipo e duração de treinamento,

bem como pela presença ou não de patologias. Vários estudos evidenciaram diminuição dos níveis de ET-1, quando associada à prática de exercícios físicos em pessoas saudáveis (MAEDA et al., 2001; MAEDA et al., 2003), bem como em estudos pré-clínicos (PARK e OMI, 2015). Também já havia sido relatado, num estudo de 2007, que o aumento normal de ET-1, decorrente da velhice, poderia ser reduzido através da prática de exercício físico regular, como visto neste estudo realizado com homens saudáveis (VAN GUILDER et al., 2007).

Todos esses dados demonstram que o metabolismo do NO e da ET-1 pode sofrer alteração pela prática de exercício físico. No entanto, os efeitos do exercício físico no metabolismo desses fatores derivados do endotélio, em pessoas com HAP, oferecidos pela literatura, são bastante escassos.

Sabe-se, porém, que os mecanismos patogênicos envolvidos com a geração e a progressão da HP podem ser estudados a partir de modelos animais, que servem para desenvolver novas ferramentas terapêuticas para melhorar a qualidade de vida e o prognóstico dos pacientes com a doença.

1.1.6 Modelo Experimental de HAP

Há mais de três décadas, dois modelos animais têm se destacado e servido como auxílio nessa busca incessante de novas respostas para essa doença tão obscura e fatal. São eles a exposição crônica à hipóxia e a administração (via oral ou injeção subcutânea/intraperitoneal) de MCT ou MCT pirrol (MCTP), em diferentes espécies animais (LAMÉ et al., 2000; FARAHMAND; SINGAL; HILL, 2004; DUMITRASCU et al., 2008; STENMARK et al., 2009). A MCT é extraída de plantas do gene *Crotalaria*. No Brasil, essas plantas recebem o nome de “xique-xique”, “guizo-de-cascavel”, “chocalho de cascavel”, pois possuem vagens secas que emitem som semelhante ao da cauda da cascavel (WILLIAMS e MOLYNEUX, 1987). Ainda no país, já foram caracterizadas mais de 40 espécies, sendo muitas delas consumidas por animais, principalmente em períodos de seca e escassez de alimentos (TOKARNIA et al., 2000).

A MCT gera a forma mais agressiva de HP em modelos animais (KAY e HEATH, 1969; WILSON et al., 1992). A *Crotalaria* é rica em alcaloides pirrolizidínicos

que são responsáveis por desencadear os efeitos pneumotóxicos, nefrotóxicos, cardiotoxicos, fetotóxicos, carcinogênicos, hepatóxicos, inflamação, hemorragia e febre (MATTOCKS, 1986; THOMAS et al., 1996; KOSOGOF et al., 2001). A MCT é o principal alcaloide pirrolizidínico encontrado nessas plantas e é ativamente oxidada *in vivo* pelo complexo enzimático da citocromo P-450 no fígado, formando intermediários altamente reativos (WILSON et al., 1992; REID et al., 1998). O seu metabólito ativo, a dehidromonocrotalina (DMCT), é transportada até os pulmões e tem como principal ação uma inflamação vascular local, um aumento da liberação de agentes vasoconstritores e uma hipertrofia da túnica média. Somadas, essas ações aumentam a resistência vascular pulmonar, a pós-carga imposta ao VD, gerando hipertrofia cardíaca mal-adaptativa (caracterizada por aumento de colágeno intersticial e diminuição no volume de cardiomiócitos) e *Cor pulmonale*, como evidenciado na figura 8 (MEYRICK et al., 1980; REINDEL et al., 1990; HESSEL et al., 2006).

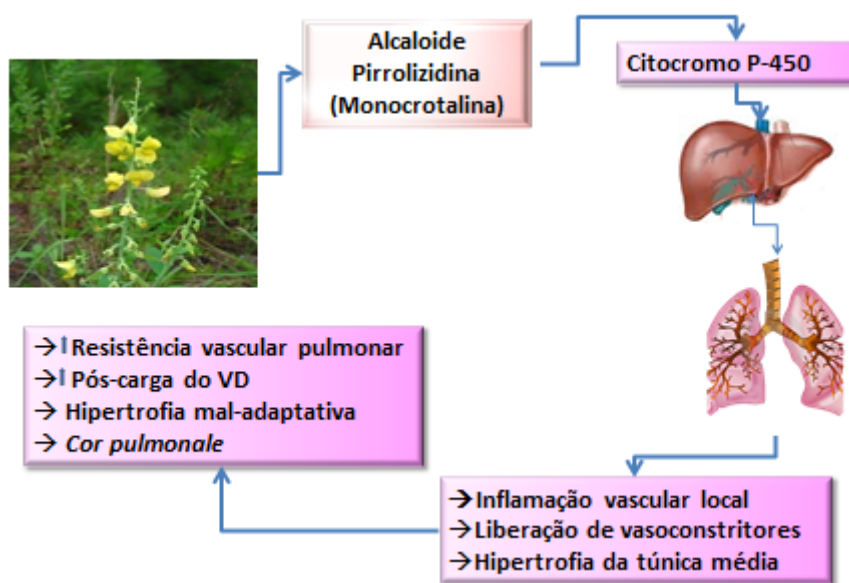


Figura 8. Modelo de HAP induzida por MCT.

O envolvimento do endotélio pulmonar como um alvo para toxicidade pela MCT pode ser explicado pela proximidade circulatória do fígado com o endotélio pulmonar (MEYRICK e REID, 1982; WILSON et al., 1992; HORON e ROTH, 1992; AGGARWAL et al., 2013). Outra possível explicação para ação tóxica seletiva da MCT sobre as células do pulmão decorre da existência de um número grande de mastócitos

que possuem a enzima 5-hidroxitriptamina, que pode ser a enzima desencadeadora de parte da gênese da lesão vascular pulmonar produzida pela MCT (TURNER et al., 1965; LALICH et al., 1961). Entretanto, o mecanismo de ação pulmonar da MCT ainda não está totalmente esclarecido. No entanto, sabe-se que após a sua ativação em DMCT, provoca megalocitose nas células endoteliais, diminuição na produção de óxido nítrico, aumento na expressão de proteínas envolvidas com a proliferação e apoptose celular (ROSENBERG e RABINOVITCH, 1988).

Assim, esse modelo animal tem sido o mais utilizado devido à sua simplicidade e por apresentar baixo custo e alta reprodutibilidade quando comparado com outros modelos animais de HAP (GOMEZ-ARROYO et al., 2012). O modelo de MCT permite o avanço na compreensão dos mecanismos ligados à doença que ainda não estão bem esclarecidos, bem como definir possíveis estratégias terapêuticas para utilização na clínica.

A utilização desse modelo já é uma prática cotidiana do nosso grupo de pesquisa, onde resultados de 21 dias após a injeção única intraperitoneal de MCT, evidenciaram modificações morfológicas e funcionais do VD (SILVA et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2015). Os efeitos do exercício físico sobre a hipertrofia e o estresse oxidativo cardíaco nesse modelo também já foram estudados, evidenciando, por exemplo, uma redução nos níveis de H_2O_2 e uma diminuição de apoptose celular, no VD (SOUZA-RABBO et al., 2008; COLOMBO et al., 2015).

A controvérsia encontrada na literatura sobre os efeitos do exercício físico aeróbico na HAP e à escassez de dados sobre os efeitos do exercício físico aeróbico no metabolismo dos dois principais fatores derivados do endotélio envolvidos na disfunção endotelial, NO e ET-1, bem como sobre o estresse oxidativo, justifica a necessidade de realização deste trabalho.

2 HIPÓTESE

A melhora funcional promovida pelo treinamento físico aeróbio está relacionada com uma diminuição do estresse oxidativo e com um efeito modulador sobre o desequilíbrio entre vasodilatadores (NO) e vasoconstritores (ET-1) no parênquima pulmonar de ratos com HAP.

3 OBJETIVO GERAL

Verificar a influência do treinamento físico aeróbio sobre o estresse oxidativo pulmonar e o seu papel modulador no metabolismo do NO e da ET-1 no parênquima pulmonar de ratos com HAP.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a influência do exercício físico sobre os parâmetros morfométricos (peso corporal, hipertrofia cardíaca, hipertrofia do VD e congestão hepática);
- Analisar a influência do exercício físico aeróbio sobre parâmetros ecocardiográficos no VD nos diferentes grupos experimentais;
- Averiguar a influência do exercício físico aeróbio sobre as concentrações do O_2^- e H_2O_2 no parênquima pulmonar nos diferentes grupos experimentais;
- Mensurar a atividade da NOX e NOS no parênquima pulmonar, nos diferentes grupos experimentais;
- Investigar a influência do exercício físico na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx no parênquima pulmonar nos diferentes grupos;
- Verificar a concentração de NO_2^- , no parênquima pulmonar, ao final do protocolo experimental nos diferentes grupos experimentais;
- Examinar a lipoperoxidação, no parênquima pulmonar, nos diferentes grupos pela técnica de quimiluminescência.
- Analisar o dano oxidativo a proteínas, a partir da técnica de carbonilas, nos diferentes grupos experimentais.
- Quantificar o imunocontéudo das enzimas SOD, CAT e eNOS no parênquima pulmonar nos diferentes grupos experimentais;
- Quantificar a influência do exercício físico aeróbio sobre o imunocontéudo dos receptores da ET-1 (ET-A e ET-B) no parênquima pulmonar nos diferentes grupos experimentais;
- Avaliar o papel do exercício físico aeróbio sobre a densidade da iNOS e nitrotirosina, no parênquima pulmonar, pela técnica de imuno – histoquímica, nos diferentes grupos experimentais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

O estudo desenvolvido seguiu a Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008, que estabelece normas para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de animais; os Princípios Éticos na Experimentação Animal, formulados pelo CONCEA, assim como aquelas normas contidas nas Diretrizes da Prática de Eutanásia, formulada em 2013 pela mesma instituição. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob o número de homologação 28955.

Foram utilizados 28 ratos machos Wistar, pesando aproximadamente 120 gramas advindos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CREAL – UFRGS). Os animais foram mantidos em caixas plásticas com medidas de 270 x 260 x 310 mm, totalizando três ou quatro animais por caixa. Todos os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (21°C), ciclo “claro-escuro” de 12 horas e umidade relativa de 70%. Água e ração comercial foram ofertadas “*ad libitum*”. A evolução do peso foi aferida a cada três dias.

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS – TAMANHO AMOSTRAL

Foram estabelecidos quatro grupos experimentais, sendo que o tamanho amostral foi calculado *a priori*.

- a) **Grupo Controle Sedentário - CS** (n=6) → animais que receberam a injeção de solução salina e que não foram submetidos ao protocolo de exercício físico aeróbio.
- b) **Grupo Controle Treinado – CT** (n=6) → animais que receberam a injeção de solução salina e que foram submetidos ao protocolo de exercício físico aeróbio.
- c) **Grupo Monocrotalina Sedentário - MS** (n=8) → animais que receberam a injeção de monocrotalina e que não foram submetidos ao protocolo de exercício físico aeróbio.

- d) **Grupo Monocrotalina Treinado - MT** (n=8) → animais que receberam a injeção de monocrotalina e que foram submetidos ao protocolo de exercício físico aeróbio.

4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.3.1 Desenho experimental (figura 9)

1. Os animais realizaram um pré-treinamento em esteira que teve duração de duas semanas;
2. Após o final do protocolo de pré-treino, os animais dos grupos CT e MT realizaram teste de velocidade máxima;
3. Os animais dos grupos MS e MT receberam dose única intraperitoneal de MCT (60 mg/Kg). Os animais dos grupos CS e CT receberam o mesmo volume de solução salina;
4. Dois dias após a indução (injeção de MCT) da HAP, os animais dos grupos CT e MT iniciaram o protocolo de treinamento físico em esteira adaptada para ratos (duração: três semanas). Os demais animais apenas ficavam no mesmo ambiente e eram manuseados para terem contato com os pesquisadores;
5. Ao término da segunda semana de treinamento físico, os animais realizaram novamente um teste de velocidade máxima para reajuste da intensidade.
6. 24 horas após a última sessão do protocolo de treinamento físico aeróbio, os animais de todos os grupos foram anestesiados, via injeção intraperitoneal, com quetamina (90 mg/Kg) e xilasina (10 mg/Kg), e foi realizada a análise ecocardiográfica. Com o objetivo de induzir a morte por sobrecarga anestésica, os animais receberam uma nova injeção i.p. de quetamina e xilasina. A confirmação da morte foi através do deslocamento cervical. Os pulmões foram retirados para realização das análises bioquímicas, imuno-histoquímicas e de imunocontéudo por Western Blot.

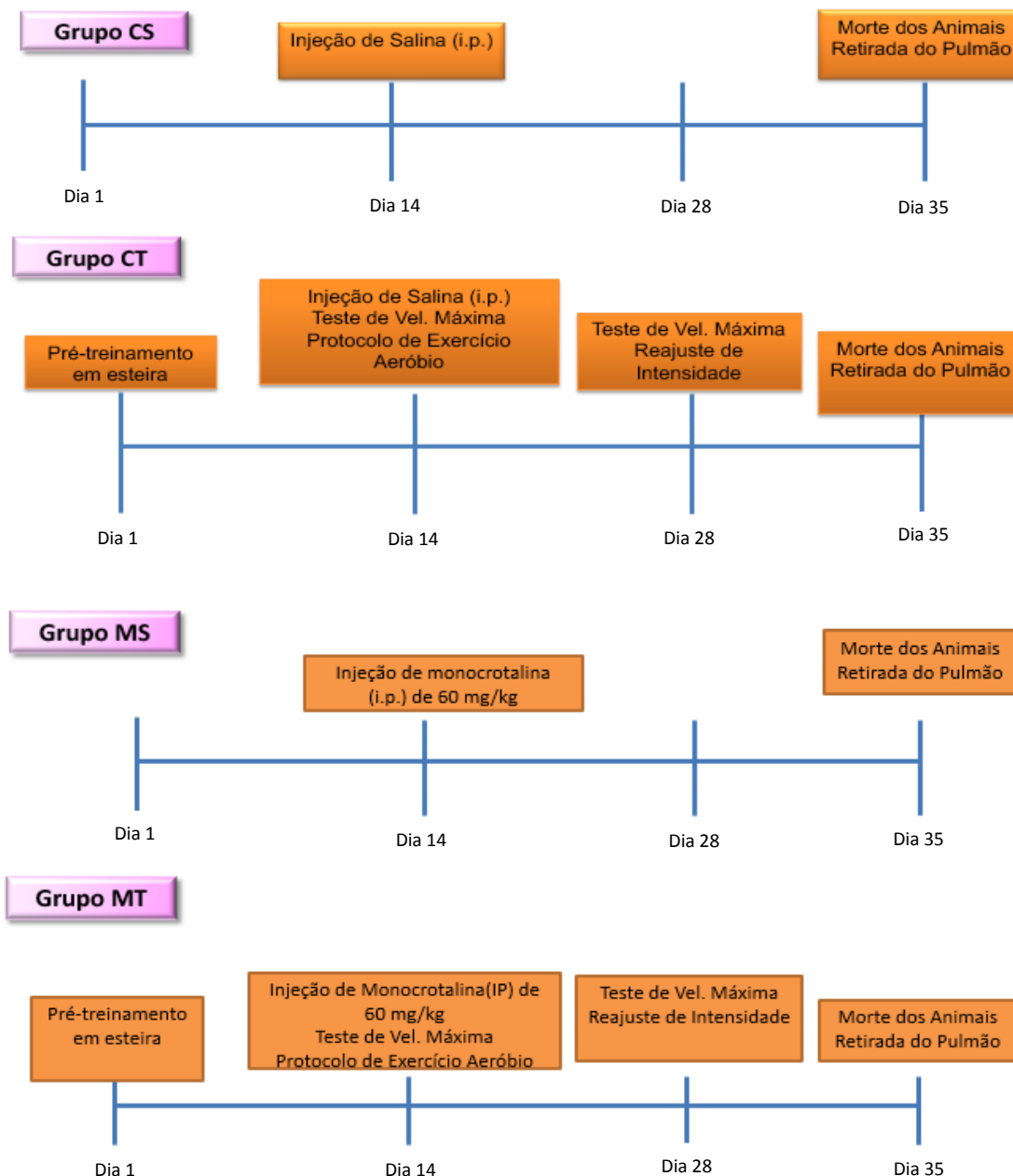


Figura 9. Desenho experimental

4.3.2 Protocolo de Exercício Físico Aeróbio

Os animais dos grupos CT e MT foram submetidos a um período de pré-treinamento (duas semanas) e ao protocolo de exercício físico em esteira (três semanas). A frequência semanal do treinamento foi de cinco sessões, sendo estas realizadas em esteira adaptada para ratos Inbramed KT-01. A duração da sessão, bem como a intensidade, aumentou gradativamente no período de pré-treinamento, até atingir a

duração de 60 minutos e a velocidade de 0,9 km/h, respectivamente. Finalizadas as duas semanas de pré-treinamento, foi realizado o teste de velocidade máxima, com o intuito de ajustar a intensidade do exercício em 60% do consumo máximo de oxigênio (VO_2 máximo). Foi dado início ao protocolo de treinamento, sendo que no final da segunda semana do mesmo, os animais realizaram um novo teste de velocidade máxima para reajuste da carga de trabalho. A intensidade de 60% do VO_2 máximo, obtida através da realização do teste de velocidade máxima em esteira, foi baseada em estudo publicado por Rodrigues e colaboradores, no ano de 2007, como mostrado na tabela 2, que correlacionaram o teste de velocidade máxima com o VO_2 máximo em ratos diabéticos com IC, servindo dessa forma, como maneira indireta de avaliação do VO_2 máximo.

Tabela 2. Protocolo de treinamento físico baseado em Rodrigues et al, 2007.

Semana	Período de Adaptação		Período de Treinamento	
	Tempo (Min.)	Velocidade (km/h)	Tempo (Min.)	Intensidade
Primeira	45	0,6	-----	-----
Segunda	60	0,9	-----	-----
Terceira	-----	-----	60	60% VO_2
Quarta	-----	-----	50	60% VO_2
Quinta	-----	-----	50	60% VO_2

4.4 ANÁLISE ECOCARDIOGRÁFICA

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

Os seguintes cálculos foram realizados: 1. $VS = PAcsa (2D) \times VTI$ (doppler), $DC = VS \times HR$ e 2. $PAcsa = (PAD/2)^2 \times 3,14$. Onde, PAcsa é a área de secção transversal da artéria pulmonar; VTI é : integral tempo velocidade; HR é a frequência cardíaca, medida no momento de fluxo pela artéria pulmonar; e PAD é o diâmetro da artéria pulmonar durante a sístole ventricular. 3. $FAC = (\text{área diastólica final do VD} - \text{área sistólica final do VD}) / \text{área diastólica final do VD} \times 100$. 4. $FS = (\text{diâmetro diastólico final do VD} - \text{diâmetro sistólico final do VD}) / \text{diâmetro diastólico final do VD} \times 100$. 5. $IPM = (\text{tempo de fechamento da valva tricúspide} - \text{tempo de ejeção pela artéria pulmonar}) / \text{tempo de ejeção pela artéria pulmonar}$.

4.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

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

4.6 PREPARAÇÃO DOS HOMOGENEIZADOS

Os pulmões direitos 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 (10µL/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 aliqotado e armazenado em freezer a -80°C, para realização das medidas propostas (LLESUY et al., 1985).

4.7 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas do tecido 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 espectrofotômetro a 625 nm e os resultados expressos em mg/mL.

4.8 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

4.8.1 Determinação da concentração de Ânion Superóxido ($O_2^{\cdot -}$)

Essa técnica mede, por espectrofotômetro, a reação de oxidação da adrenalina com $O_2^{\cdot -}$ presente na amostra, levando à formação de um composto mensurável em 480 nm. Os homogeneizados de pulmão foram submetidos à uma primeira centrifugação (2500 rpm durante 10 min, a 4°C). Em seguida, o pellet foi desprezado e, foi realizada uma nova centrifugação com o sobrenadante (8000 rpm por 10 min, a 4°C) para isolamento das mitocôndrias. A reação é iniciada pela adição de adrenalina (60 mM) (BOVERIS, 1984).

4.8.2 Determinação da concentração de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

O ensaio foi baseado na oxidação do vermelho de fenol mediada pela peroxidase de rabanete e pelo peróxido de hidrogênio. As amostras de pulmões foram homogeneizadas em KCl (1,15% w/v) e PMSF (20 mmol/L), e centrifugadas (8000 rpm, durante 20 minutos a 4 °C). Os sobrenadantes foram usados para as análises posteriores. Foi construída uma curva padrão com concentrações variadas de H_2O_2 de 10, 20 e 30 nmol/L. Após a adição do H_2O_2 na curva padrão e dos sobrenadantes dos homogeneizados nos poços da microplaca, o experimento continuou com a adição do tampão PRS (solução de vermelho de fenol). Depois de adicionar o tampão PRS, a microplaca foi agitada à temperatura ambiente durante 25 min. Em cada poço com amostra, foi adicionado 1 mol/L de hidróxido de sódio (NaOH). Em seguida, a leitura

foi realizada a 610 nm e a concentração de H_2O_2 no parênquima pulmonar foi expressa em nmol/g de tecido (PICK; KEISARI, 1980).

4.8.3 Atividade da NADPH Oxidase

A NADPH oxidase é uma das fontes endógenas mais importantes de 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 técnica espectrofotométrica, seguindo o consumo de NADPH a 340 nm. No homogeneizado foi adicionado tampão fosfato 100 mmol/L pH 7,4 e NADPH 1 mg/mL. Os resultados foram expressos em nmol NADPH/min.mg proteína (WEI et al., 2006).

4.8.4 Atividade das Enzimas Antioxidantes

4.8.4.1 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada com base na inibição da reação de radicais superóxido com o pirogalol, medida a um comprimento de onda de 420 nm. A atividade dessa enzima foi expressa em unidades por miligrama de proteína (MARKLUND, 1985).

4.8.4.2 Atividade da Enzima Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi medida através do decréscimo na absorbância do H_2O_2 , no comprimento de onda de 240 nm. Foram utilizados os seguintes reagentes, solução tampão de fosfato de sódio 50 mmol/L (pH=7,4) e peróxido de hidrogênio 0,3 mol/L. A atividade foi expressa em pmoles de H_2O_2 reduzidos por minuto por mg de proteína (BOVERIS e CHANCE, 1973).

4.8.4.3 Atividade da Enzima Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi baseada no consumo da NADPH e foi medida pela absorbância a um comprimento de onda de 340 nm. A atividade foi expressa como nanomoles de peróxido/hidroperóxido reduzidos por minuto por miligrama de proteína (FLOHÉ e GÜNZLER, 1984).

4.8.5 Lipoperoxidação por Quimiluminescência (QL)

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 uma sala escura, com frascos de vidro mantidos na penumbra, a fim de evitar a ativação da fosforescência pela luz fluorescente. O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistiu em 3,5 mL de solução reguladora (KCl 140 mmol/L e fosfato 20 mmol/L, pH=7,4), na qual foi adicionado 0,5 mL de homogeneizado de pulmão direito. Após, foi realizada uma leitura inicial, considerando a emissão de luz basal pelo homogeneizado. O hidroperóxido orgânico utilizado foi o hidroperóxido de tert-butila (40 mmol/L), sendo adicionado 15 µl no meio da reação, para uma concentração final de 3 mmol/L. Foi medida a emissão de luz e, desta, foi descontada a emissão basal para fins de cálculo. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps) por mg de proteína (FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991).

4.8.6 Avaliação do Dano Oxidativo a proteínas (Carbonilas)

Essa análise está baseada na medida das carbonilas provenientes da oxidação de proteínas por radicais livres. Primeiramente, os homogeneizados de pulmão foram incubados com 2,4-dinitro fenil hidrazina (DNPH), enquanto o branco foi incubado com ácido clorídrico, por uma hora, à temperatura ambiente e ao abrigo de luz, ocorrendo agitação a cada 15 minutos. Em seguida, acrescentou-se TCA (20%) e deixou-se em repouso por 10 minutos e centrifugou-se. Desprezou-se o sobrenadante, acrescentou-se

agora TCA (10%), centrifugou-se novamente, e fez-se três lavagens do sedimento com uma mistura de acetato de etila-etanol (1:1), seguidas de centrifugações. Dissolveu-se, então, o sedimento em uma solução de guanidina, agitando-o durante dez minutos sob temperatura de 37°C. Logo após fez-se a leitura das amostras e dos brancos de cada uma delas em espectrofotômetro a 360 nm. O resultado foi expresso em nmoles/mg de proteínas (REZNICK e PACKER, 1994).

4.8.7 Nitritos Totais (NO₂⁻)

A quantidade total de NO₂⁻ foi determinada no homogeneizado de pulmão, de acordo com a técnica descrita por Granger e colaboradores. O NO₂⁻ é analisado pela reação deste com o reagente de Griess, que forma um composto corado. Essa reação foi iniciada pela adição do reagente de Griess (100µl), sendo a coloração final detectada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 540 nm e os resultados expressos em mmol/L (GRANGER et al, 1999).

4.8.8 Atividade da enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS)

A atividade da NOS em homogeneizado de pulmão foi avaliada pela medida da conversão da oxi-hemoglobina (HbO₂) em met-hemoglobina induzida por NO, como descrito por Valdez e colaboradores (2005). O meio de reação foi composto por (em mmol/L): CaCl₂ 1,8; KCl 2,7; MgCl₂ 0,23; NaCl 137; NaH₂PO₄ 3,6; glicose 5,0; HEPES 10; pH 7,4, contendo 2 mol/L HbO₂ e 1 mmol/L de L-arginina. A atividade da NOS foi expressa em nmolesNO/min/mg de proteína.

4.9 AVALIAÇÃO POR WESTERN BLOT

Os pulmões direitos foram homogeneizados em um homogeneizador (Ultra-Turrax, Bosch, Atibaia, SP, Brasil) utilizando-se um tampão de lise celular (10x) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EUA), diluído em água Mili-Q e PMSF. A suspensão foi centrifugada a 8000 x g, durante 15 minutos, a 4 °C. Quarenta

microgramas de proteína foram utilizados para uma eletroforese unidimensional em SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (ARAÚJO et al., 2006; LAEMMLI, 1970). As proteínas separadas durante a eletroforese foram transferidas para membranas de polivinilideno difluoreto (PVDF), da empresa Bio-Rad (Bio-Rad, São Paulo, SP, Brasil). As membranas foram processadas por imunodeteção, utilizando os seguintes anticorpos primários: anticorpo anti-ETB, anti-ETA, anti-SOD, anti-CAT, anti-eNOS, α -actinina. Todos os anticorpos foram obtidos da empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). A ligação dos anticorpos primários foi detectada com anticorpos secundários conjugados à peroxidase de rabanete. As membranas foram reveladas a partir da utilização de reagentes para detecção por quimiluminescência. As autoradiografias foram analisadas com o programa ImageJ (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, EUA). A densidade óptica (DO) de cada amostra foi normalizada de acordo com o imunoc conteúdo de α -actinina. A concentração de proteínas no parênquima pulmonar foi determinada pelo método de Lowry, utilizando albumina de soro bovino como referência (LOWRY et al., 1951).

Tabela 3. Anticorpos utilizados nas análises por Western Blot

Anticorpo	Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário	Origem	Marca
ET-A	1:500	1:5000	Rabbit	Santa Cruz
ET-B	1:500	1:5000	Mouse	Santa Cruz
eNOS	1:250	1:5000	Mouse	Santa Cruz
CAT	1:500	1:5000	Rabbit	Santa Cruz
SOD	1:500	1:5000	Mouse	Santa Cruz
α-actinina	1:500	1:5000	Mouse	Santa Cruz

Concentração usada para anticorpos primário e secundário e suas origens.

4.10 AVALIAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS

O material (pulmão esquerdo de ratos) foi fixado em formalina tamponada a 10%, processado (desidratação em álcool etílico de concentrações crescentes,

clareamento em xilol, impregnação pela parafina fundida) e incluído em parafina. Os blocos de parafina contendo os tecidos incluídos foram seccionados pela navalha de aço do micrótomo, obtendo-se cortes de 5 µm de espessura. As lâminas preparadas foram coradas pela técnica da hematoxilina e eosina (HE). Na sequência os mesmos blocos de parafina foram seccionados no micrótomo, obtendo-se novos cortes com 3µm de espessura, desparafinizados por 1 hora na estufa e recuperação antigênica em pH High 20 minutos à 97^oC. Estes foram corados pela técnica imuno-histoquímica e montadas em lâminas sinalizadas, utilizando-se os seguintes anticorpos monoclonais: nitrotirosina (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA diluição 1:300 por 20 minutos) e o anticorpo iNOS (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA diluição 1:200 por 50 minutos). O dispositivo automatizado de coloração utilizado foi AutoStainer Dako Link 48AS3003D1307. Após o procedimento de coloração as lâminas passaram em duas cubas com álcool absoluto e depois em duas cubas com xilol para após serem montadas com as lamínulas. Havia controle externo em todas as baterias. A análise das lâminas de imuno-histoquímica foi realizada pelos médicos patologistas Alessandra Guerra Eifler de Godoy e Isnard Elman Litvin, do Instituto de Pesquisas Clínicas para Estudos Multicêntricos, da Universidade de Caxias do Sul, sendo as lâminas analisadas por microscopia óptica (DME; Leica Microsystems Inc., Nova Iorque, EUA) e câmara digital (CE 3; Leica Microsystems Inc., Nova Iorque, EUA). As variáveis categóricas foram analisadas por descrição de frequência relativa, representadas em uma escala de coloração dos anticorpos com os seguintes dados: Grau 0 (ausente), grau 1 (leve), grau 2 (moderado) e grau 3 (acentuado).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os resultados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância de duas vias (ANOVA 2-way) e complementadas pelo teste de Student-Newman-Keuls, sendo os resultados expressos como média ± desvio padrão da média. Os desfechos que não apresentaram distribuição normal foram analisados pelo teste estatístico de comparações múltiplas de *Kruskal-Wallis* e, os resultados mostrados como mediana e intervalos interquartis. Foi considerada uma probabilidade de erro alfa menor ou igual que 0,05 ($P \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1. MASSA CORPORAL

A figura 10 contém os dados referentes ao peso (em g) dos animais nos dias 1, 14, 28 e 35. O dia 1 corresponde a primeira pesagem dos animais. O dia 14 corresponde ao peso dos animais uma semana após a indução com MCT. Dia 28 corresponde ao final da terceira semana após a indução e o dia 35 corresponde ao peso dos animais no último dia de protocolo experimental. Essas pesagens foram realizadas para acompanhamento do crescimento e do ganho de massa corporal durante todo o protocolo experimental.

No dia 1, os animais estavam, em média, com 90 g nos grupos CS e CT e com 100 g nos grupos MS e MT, respectivamente. Esse dado corresponde ao peso dos animais na primeira pesagem, como dito anteriormente. A partir do final da terceira semana, ou seja, no dia 28, os animais dos grupos MS e MT, apresentaram massa corporal menor do que a medida nos animais dos grupos CS e CT, indicando uma ação da doença sobre o ganho de peso nesses animais. Os animais do grupo MT, porém, tiveram maior ganho da massa corporal durante essas semanas iniciais, quando comparados com o grupo MS, indicando um possível efeito benéfico do exercício na manutenção da massa corporal. Ao longo da última semana, notou-se que tanto os animais do grupo MS quanto os animais do grupo MT, tiveram menor ganho de massa corporal quando comparados com os seus grupos controle, CS e CT, respectivamente, sendo esta redução ainda mais acentuada no grupo MT.

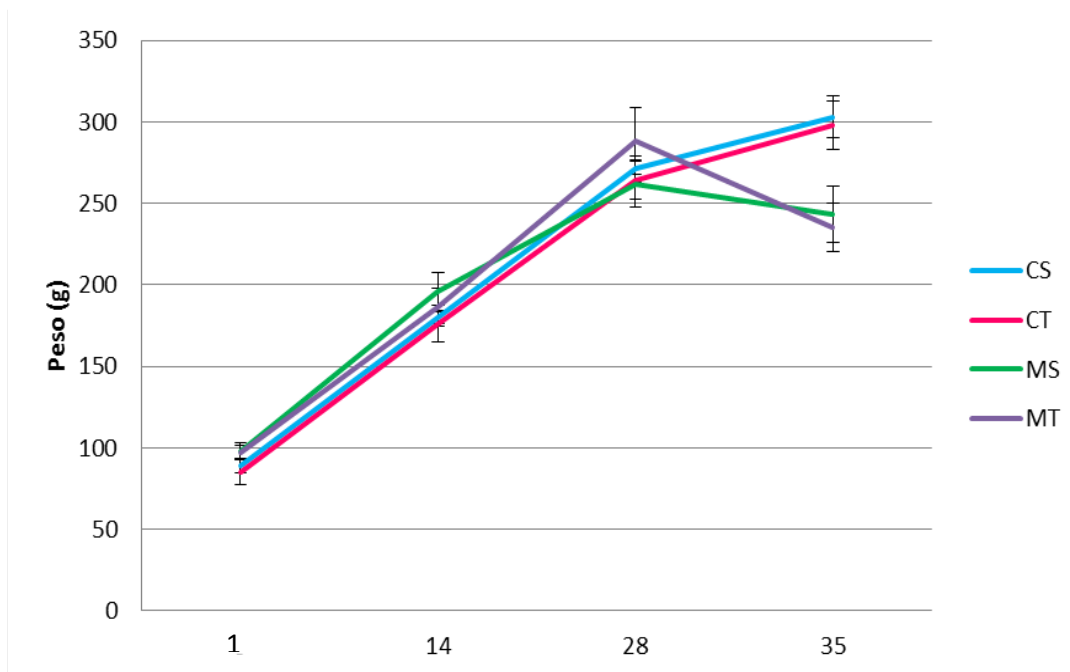


Figura 10. Massa corporal (g) nos distintos grupos experimentais durante todo o protocolo experimental. CS= controle sedentário; MS= monocrotalina sedentário; CT= controle treinado; MT= monocrotalina treinado. Valores são expressos como média \pm desvio padrão (n=5-7) em cada grupo. ^a(P<0,05) comparado aos grupos CS e CT. ^b(P<0,05) comparado aos grupos CS e MS. ^c(P<0,05) comparado com o grupo CS. ^d(P<0,05) comparado ao CT e ^e(P<0,05) comparado ao MS.

A massa corporal final dos animais no último dia de protocolo experimental é apresentada também na figura 11, para melhor visualização. Nessa pesagem foi notada redução do ganho de peso nos grupos MS e MT quando comparados aos seus controles (CS e CT), onde essa diminuição esteve pronunciada no grupo MT, quando este foi comparado ao grupo MS, evidenciando que o treinamento físico potencializou a resposta da MCT nesses animais em relação ao ganho de peso, durante a última semana do protocolo de treinamento.

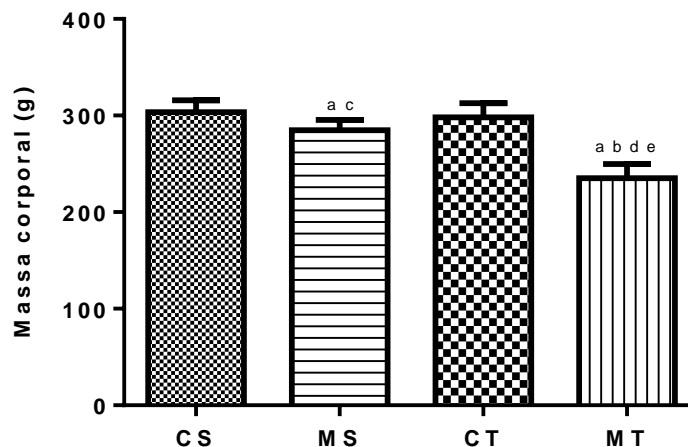


Figura 11. Massa corporal final (g) nos distintos grupos experimentais no último dia do protocolo experimental. CS= controle sedentário; MS= monocrotalina sedentário; CT= controle treinado; MT= monocrotalina treinado. Valores são expressos como média \pm desvio padrão (n=5-7) em cada grupo. ^a(P<0,05) comparado aos grupos CS e CT. ^b(P<0,05) comparado aos grupos CS e MS. ^c(P<0,05) comparado com o grupo CS. ^d(P<0,05) comparado ao CT e ^e(P<0,05) comparado ao MS.

5.2 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA – HIPERTROFIA CARDÍACA

A hipertrofia cardíaca foi mensurada a partir da massa total do coração (g), dividido pela massa corporal do animal (g). A hipertrofia ventricular direita foi expressa a partir dos seguintes índices: massa do VD (g)/ comprimento da tibia (cm), massa do VD (g) / massa do VE (g) e pela massa do VD (g) / massa corporal (g). Parâmetros morfométricos (paramétricos e não paramétricos) estão apresentados na tabela 4.

O índice de HC evidenciou aumento nos animais dos grupos MS e MT quando estes foram comparados aos grupos CS e CT. Esse padrão de hipertrofia foi evidenciado no VD dos mesmos animais, onde os três parâmetros, citados acima, apresentaram aumentos de 2 vezes no grupo MS em relação ao CS e 2,3 vezes no grupo MT em relação ao CT. Quando a comparação entre os grupos MS e MT foi realizada, não foram encontradas diferenças significativas. Assim, a partir desses dados, ficou evidenciada a hipertrofia cardíaca direita dos animais que receberam MCT.

Tabela 4. Parâmetros morfométricos (índices de HC e do VD). CS= controle sedentário; MS= monocrotalina sedentário; CT= controle treinado; MT= monocrotalina treinado. Valores são expressos como média \pm desvio padrão (n=5-7), em cada grupo, exceto no dado VD/Massa corporal que foi expresso como mediana (intervalo interquartil 25; intervalo interquartil 75), (n=5-7) em cada grupo.

Parâmetro	CS	MS	CT	MT
Coração/Massa Corporal (mg/mg)	2,6 \pm 0,1	3,1 \pm 0,3 ^{ac}	2,5 \pm 0,1	3,5 \pm 0,4 ^{ad}
VD/Tíbia direita (mg/cm)	5,4 \pm 0,4	9,6 \pm 2,4 ^{ac}	4,9 \pm 0,4	9,7 \pm 1,0 ^{ad}
VD/VE (g/g)	0,3031 \pm 0,0241	0,6003 \pm 0,1660 ^{ac}	0,2872 \pm 0,0440	0,6632 \pm 0,1058 ^{ad}
VD/Massa corporal (mg/mg)	0,6 (0,6;0,6)	1,3 (1,0;1,6) ^{ac}	0,5 (0,5;0,6)	1,4 (1,3;1,4) ^{ad}

^a(P<0,05) comparado aos grupos CS e CT. ^c(P<0,05) comparado com o grupo CS. ^d(P<0,05) comparado ao CT e ^e(P<0,05) comparado ao MS.

5.3 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA – CONGESTÃO HEPÁTICA

Esse dado foi obtido através da razão entre a massa do fígado logo após a morte do animal (peso úmido) e a menor massa obtida por pesagens consecutivas desse órgão (peso seco). Esse índice indica o grau de congestão hepática, que pode ser um fator associado ao desenvolvimento de IC. A partir da análise estatística, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais avaliados, como apresentado na tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros morfométricos (índices de congestão hepática). CS= controle sedentário; MS= monocrotalina sedentário; CT= controle treinado; MT= monocrotalina treinado. Valores são expressos como mediana (intervalo interquartil 25; intervalo interquartil 75), (n=5-7) em cada grupo.

Parâmetro	CS	MS	CT	MT
Congestão	3,20	3,28	3,23	3,40
Hepática	(3,17; 3,23)	(3,23;3,39)	(3,20;3,26)	(3,28;3,46)

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais

5.4 PARÂMETROS ECOCARDIOGRÁFICOS DO VD

O modelo animal de HAP induzido por MCT é caracterizado por apresentar alterações estruturais e funcionais no VD, especialmente pela indução de HC e, consequente ICD. Desse modo, é extremamente importante verificar os efeitos que o protocolo de treinamento físico aeróbio gera sobre a função contrátil do coração, a partir da realização de análises ecocardiográficas. Os resultados paramétricos e os não paramétricos são apresentados na tabela 6.

A razão entre o tempo de aceleração e o tempo de ejeção (TAC/TEJ) foi menor nos grupos MS e MT quando comparados com seus respectivos controles (CS e CT), bem como houve uma diminuição acentuada desse parâmetro no grupo MT quando comparado ao grupo MS, mostrando que o exercício físico aeróbio não foi capaz de reduzir a sobrecarga de pressão induzida pelo modelo e, característico da HAP. Em relação ao dado do VS, foram encontradas diferenças significativas dos grupos que receberam a MCT, (MS e MT), quando comparado aos grupos CS e CT, sendo que os animais doentes apresentaram esse valor diminuído, bem como, nesse parâmetro o exercício físico pareceu influenciar negativamente, uma vez que houve redução do valor quando comparado aos grupos sedentários (CS e MS). Esse mesmo padrão de redução nos animais MCT foi evidenciado no DC, em comparação com os seus controles. Nos dados, FAC (estima a função sistólica) e na FEC do VD, não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais, evidenciando que a prática de exercício físico aeróbio não atenuou as alterações desencadeadas pela HAP no VD desses animais. Uma das avaliações mais simples de estimar a função sistólica do VD, chamada de excursão sistólica do plano anular da tricúspide (TAPSE), onde em casos normais, está deslocada razoavelmente em direção ao ápice do VD durante a sístole, apresentou valores diminuídos nos grupos MS e MT, em relação aos controles, CS e CT, nesse parâmetro, evidenciando um prejuízo na capacidade sistólica dessa câmara cardíaca nesses animais.

Os resultados não paramétricos, IPM e razão E/A, mostram que tanto no parâmetro do índice de performance miocárdica (IPM) do VD (estima a função miocárdica total), bem como na razão E/A (indicativo da função diastólica do VD), não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Tabela 6. Parâmetros ecocardiográficos do ventrículo direito. CS= controle sedentário; MS= monocrotalina sedentário; CT= controle treinado; MT= monocrotalina treinado. Valores são expressos como média \pm desvio padrão (n=3-6) em cada grupo, exceto nos dados de IPM e razão E/A, que foram expressas como mediana (intervalo interquartil 25; intervalo interquartil 75), (n=3-6) em cada grupo.

Parâmetro	CS	MS	CT	MT
TAC/TEJ	0,28 \pm 0,02	0,21 \pm 0,06 ^{ac}	0,30 \pm 0,02	0,15 \pm 0,03 ^{ade}
VS(mL)	0,31 \pm 0,04	0,22 \pm 0,04 ^{ac}	0,28 \pm 0,03	0,16 \pm 0,02 ^{ad}
DC (mL/min)	87,9 \pm 19,2	62,8 \pm 13,9 ^{ac}	74,1 \pm 12,6	42,7 \pm 9,9 ^{abd}
TAPSE (cm)	0,24 \pm 0,02	0,18 \pm 0,04 ^{ac}	0,24 \pm 0,01	0,14 \pm 0,04 ^{ad}
FEC VD	39,0 \pm 4,6	29,1 \pm 3,3	31,3 \pm 10,7	27,5 \pm 13,5
FAC	45,2 \pm 7,3	40,4 \pm 9,8	52,8 \pm 9,1	33,4 \pm 17,1
IPM	0,42 (0,33;0,45)	0,37 (0,32;0,56)	0,42 (0,33;0,44)	0,41 (0,37;0,60)
E/A (cm/s/cm/s)	0,81 (0,69;0,94)	0,80 (0,70;0,90)	0,82 (0,69;0,94)	0,79 (0,62;0,88)

^a(P<0,05) comparado aos grupos CS e CT. ^b(P<0,05) comparado aos grupos CS e MS. ^c(P<0,05) comparado com o grupo CS. ^d(P<0,05) comparado ao CT e ^e(P<0,05) comparado ao MS; nos achados de IPM e razão E/A não foram encontradas diferenças significativas nesses parâmetros ecocardiográficos.

5.5 MEDIDAS BIOQUÍMICAS

5.5.1 Espécies reativas de oxigênio e suas fontes

5.5.1.1 Concentração do Ânion Superóxido (O₂⁻)

O ânion superóxido (O₂⁻), a primeira das espécies formadas pela redução monoelétrica do oxigênio, teve sua concentração aumentada nos grupos MS e MT quando comparado aos grupos CS e CT. Essa elevação foi visível também, no grupo MT quando comparado ao grupo MS, inferindo um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (Figura 12).

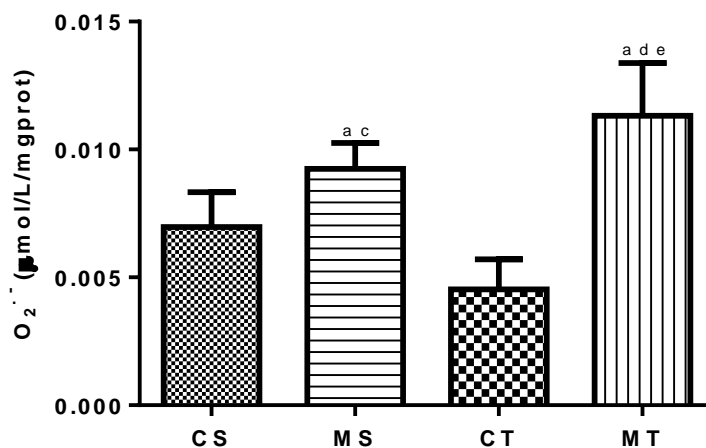


Figura 12. Concentração do O_2^- ($\mu\text{mol/L/mg prot.}$) em homogeneizado de pulmão. CS= controle sedentário; MS= monocrotalina sedentário; CT= controle treinado; MT= monocrotalina treinado. Valores são expressos como média \pm desvio padrão ($n=3-6$) em cada grupo. ^a($P<0,05$) comparado aos grupos CS e CT. ^c($P<0,05$) comparado com o grupo CS. ^d($P<0,05$) comparado ao CT e ^e($P<0,05$) comparado ao MS.

5.5.1.2 Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em homogeneizado de pulmão, não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais analisados (Figura 13).

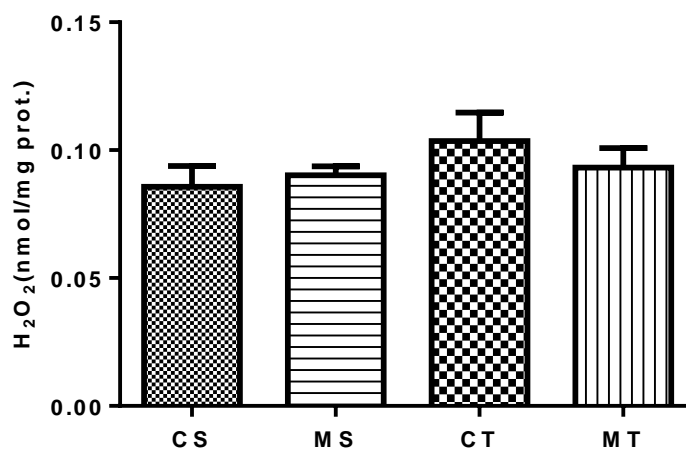


Figura 13. Concentração de H_2O_2 (nmol/mg prot.) em homogeneizado de pulmão. CS= controle sedentário; MS= monocrotalina sedentário; CT= controle treinado; MT=

monocrotalina treinado. Valores representam média \pm DP. $n= 5 - 7$ animais por grupo. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos analisados.

5.5.1.3 Atividade da NADPH Oxidase

A NADPH Oxidase é uma das principais fontes de espécies reativas. Nos grupos avaliados, não foram encontradas diferenças significativas na atividade desta enzima (Figura 14).

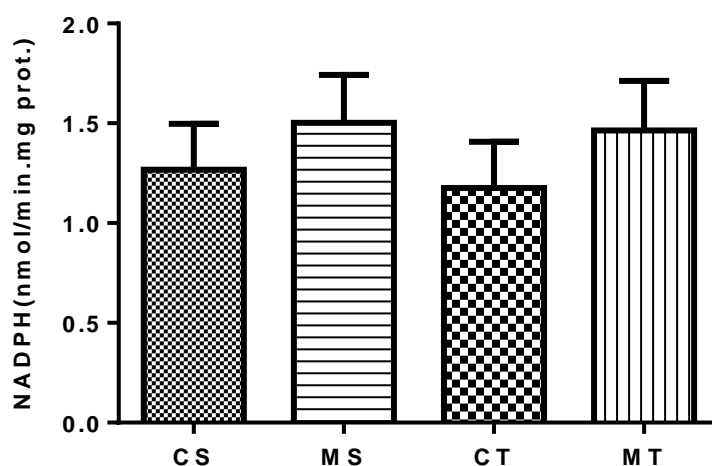


Figura 14. Atividade da NADPH oxidase (nmol/min.mg prot) em homogeneizado de pulmão. CS= controle sedentário; MS= monocrotalina sedentário; CT= controle treinado; MT= monocrotalina treinado. Valores representam média \pm DP. $n= 5 - 7$ animais por grupo. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos analisados.

5.5.2 Enzimas Antioxidantes

5.5.2.1 Atividade e imunoconteúdo da Enzima SOD

Em relação à atividade da enzima SOD, essencial para a conversão de $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 , mostrou-se alterada nos diferentes grupos. Os grupos CT e MT apresentaram níveis da atividade da SOD menores que os grupos CS e MS ($P<0,05$). Entre os grupos controles, houve diminuição ($P<0,05$) da atividade da SOD no grupo CT quando comparado ao grupo CS (Figura 15).

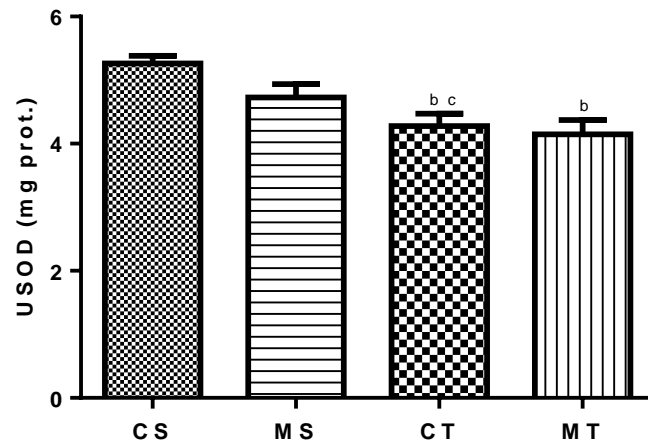


Figura 15. Atividade da SOD em homogeneizado de pulmão. CS= controle sedentário; MS= monocrotalina sedentário; CT= controle treinado; MT= monocrotalina treinado. Valores representam média \pm DP. $n= 5 - 7$ animais por grupo. ^b $P<0,05$ em comparação com os grupos sedentários (CS e MS). ^c $P<0,05$ em comparação com o grupo controle sedentário (CS).

Em relação ao imunoconteúdo da SOD, não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos experimentais (figura 16).

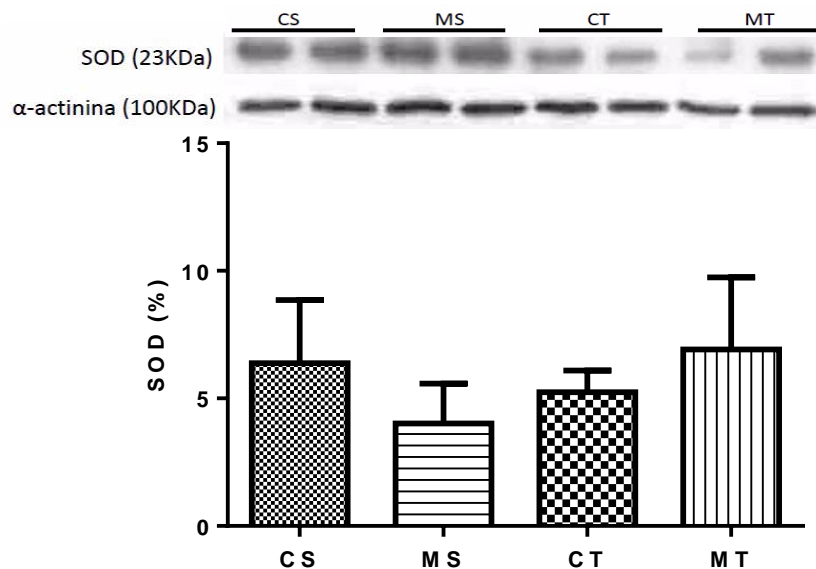


Figura 16. Imunoconteúdo da SOD (%) em homogeneizado pulmonar. CS= controle sedentário; MS= monocrotalina sedentário; CT= controle treinado; MT= monocrotalina treinado. Valores representam média \pm DP. $n= 4$ animais por grupo. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

5.5.2.2 Atividade e imunocntéudo da Enzima CAT

A CAT, cujo sítio ativo contém o grupo heme, está enclausurada no peroxissomas, e é responsável pela conversão de H_2O_2 em água, mostrou-se alterada em algumas comparações. Primeiro, foi detectada diminuição de aproximadamente 30% ($P<0,05$) em sua atividade nos grupos MCT, quando estes foram comparados com os grupos controles. Foi notada diminuição da atividade da CAT no grupo MS quando este foi comparado ao grupo CS ($P<0,05$) e o grupo MT apresentou diminuição na atividade da CAT quando comparado com o grupo CT ($P<0,05$) (Figura 17).

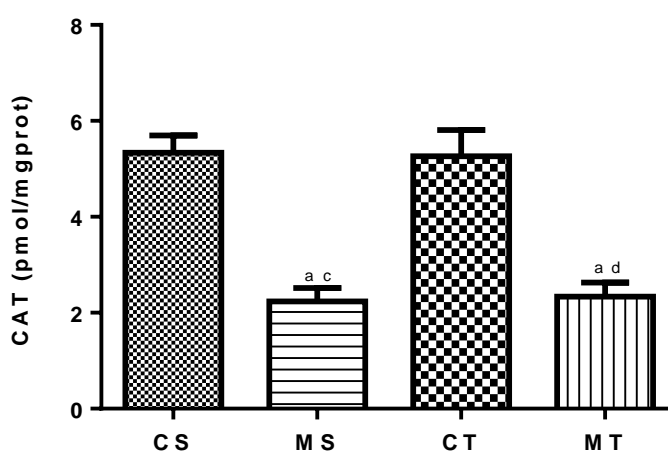


Figura 17. Atividade da CAT (pmol/mg prot.) em homogeneizado de pulmão. CS= controle sedentário; MS= monocrotalina sedentário; CT= controle treinado; MT= monocrotalina treinado. Valores representam média \pm DP. $n= 5 - 7$ animais por grupo. ^a $P<0,05$ em comparação com os grupos controles (CS e CT). ^c $P<0,05$ em comparação com o grupo controle sedentário (CS). ^d $P<0,05$ em comparação com o grupo controle treinado (CT).

Em relação ao imunocntéudo da CAT, houve diminuição da expressão do grupo MS quando comparado ao grupo CS e aumento na expressão da enzima no grupo MT quando comparado ao grupo MS (figura 18).

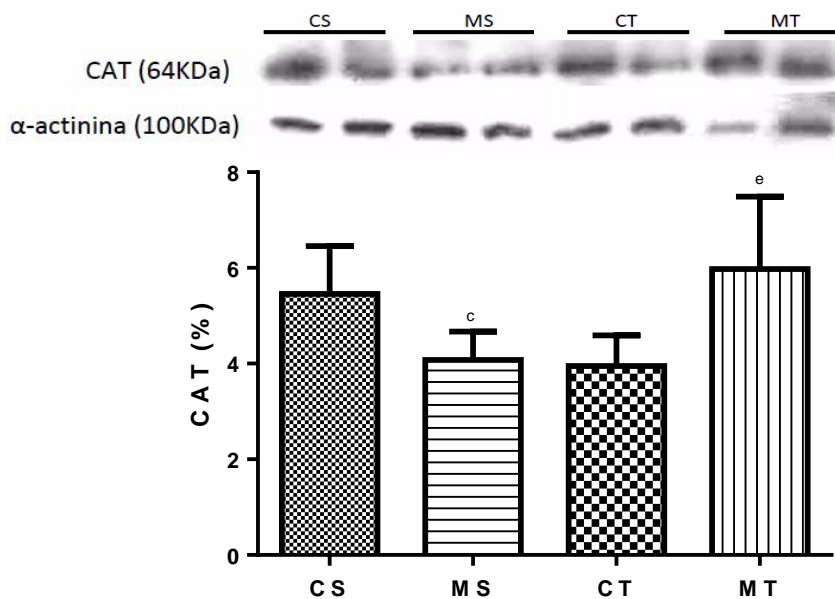


Figura 18. Imunoconteúdo da CAT (%) em homogeneizado pulmonar. CS= controle sedentário; MS= monocrotalina sedentário; CT= controle treinado; MT= monocrotalina treinado. Valores representam média \pm DP. n= 4 animais por grupo. $^{\circ}P<0,05$ em comparação com o grupo controle sedentário (CS). $^{\circ}P<0,05$ comparado ao MS.

5.5.2.3 Atividade da Enzima GPx

A enzima GPx, uma das responsáveis por reduzir o H_2O_2 e outros peróxidos a água ou alcóois, apresentou-se elevada nos grupos MS e MT, quando estes foram comparados aos seus controles (CS e CT, respectivamente). Houve aumento na atividade dessa enzima nos animais do grupo MT em relação aos animais do grupo MS (figura 19).

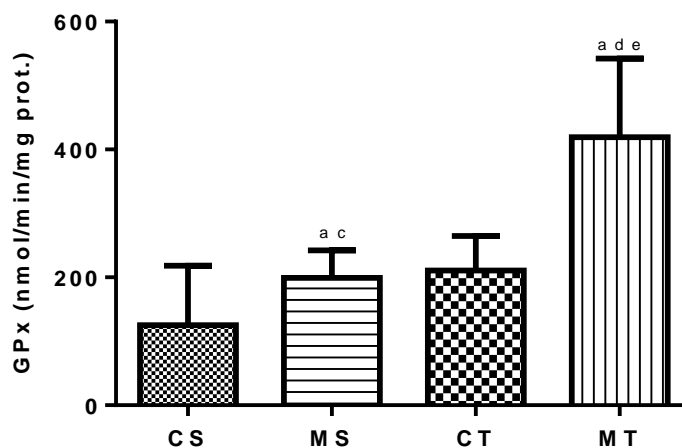


Figura 19. Atividade da GPx (nmol/min/mg prot) em homogeneizado de pulmão. CS= controle sedentário; MS= monocrotalina sedentário; CT= controle treinado; MT= monocrotalina treinado. Valores representam média \pm DP. n= 5 – 7 animais por grupo. ^aP<0,05 em comparação com os grupos controles (CS e CT). ^cP<0,05 em comparação com o grupo controle sedentário (CS). ^dP<0,05 em comparação com o grupo controle treinado (CT) e ^e(P<0,05) comparado ao MS.

5.5.3 Dano Oxidativo

5.5.3.1 Lipoperoxidação por QL

Os resultados dessa técnica apontam que ocorreu diminuição da lipoperoxidação nos grupos MCT quando comparado aos grupos controles (Figura 20).

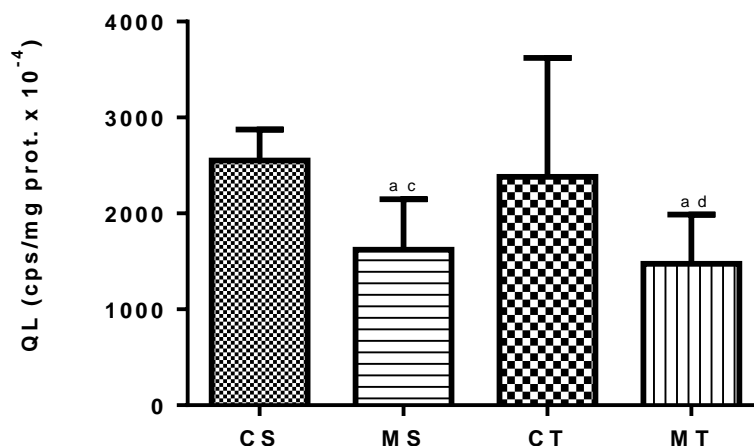


Figura 20. Lipoperoxidação por QL (cps/mg prot. x 10⁻⁴) em homogeneizado de pulmão. CS= controle sedentário; MS= monocrotalina sedentário; CT= controle treinado; MT= monocrotalina treinado. Valores representam média ± DP. n= 5 – 7 animais por grupo. ^aP<0,05 em comparação com os grupos controles (CS e CT). ^cP<0,05 em comparação com o grupo controle sedentário (CS). ^dP<0,05 em comparação com o grupo controle treinado (CT).

5.5.3.2 Dano a proteínas (carbonilas)

Os resultados apontam que ocorreu diminuição do dano oxidativo a proteínas nos grupos MS e MT quando comparado aos grupos CS e CT. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos MS e MT (figura 21)

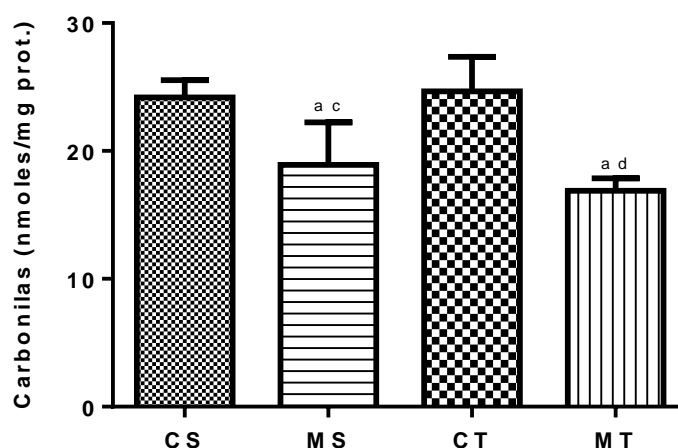


Figura 21. Dano oxidativo a proteínas (nmoles/mg prot.). CS= controle sedentário; MS= monocrotalina sedentário; CT= controle treinado; MT= monocrotalina treinado.

Valores representam média \pm DP. $n= 5 - 7$ animais por grupo. ^a $P<0,05$ em comparação com os grupos controles (CS e CT). ^c $P<0,05$ em comparação com o grupo controle sedentário (CS). ^d $P<0,05$ em comparação com o grupo controle treinado (CT).

5.5.4 Metabolismo do NO

5.5.4.1 NO_2^- Totais

A concentração de nitritos (NO_2^-) totais, um dos metabólitos do NO, em homogeneizado pulmonar, está apresentada na figura 22. Nessa análise, não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes grupos.

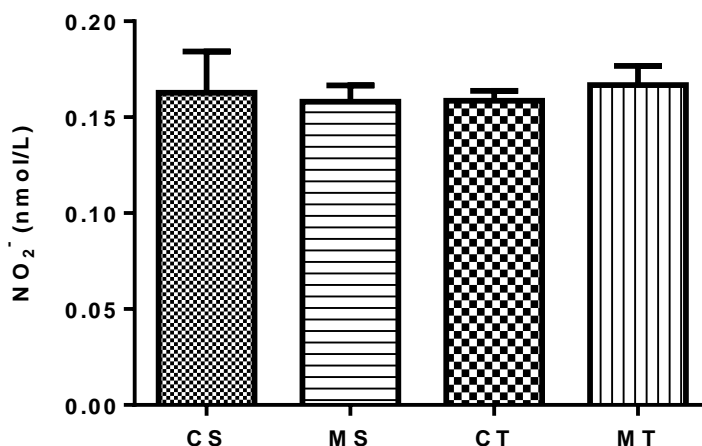


Figura 22. Concentração de NO_2^- totais (nmol/L) em homogeneizado de pulmão. CS= controle sedentário; MS= monocrotalina sedentário; CT= controle treinado; MT= monocrotalina treinado. Valores representam média \pm DP. $n= 5 - 7$ animais por grupo. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos analisados.

5.5.4.2 Atividade da Enzima NOS

A enzima óxido nítrico sintase (NOS), importante para a formação do principal fator vasodilatador derivado do endotélio, apresentou diferenças significativa ($P<0,05$) na sua atividade quando comparada com os grupos controles. Nos grupos treinados (CT e MT), a atividade da enzima NOS encontrou-se diminuída ($P<0,05$). Os grupos CT e MS

tiveram a atividade da NOS reduzida, quando comparado a do grupo CS ($P < 0,05$) (Figura 23).

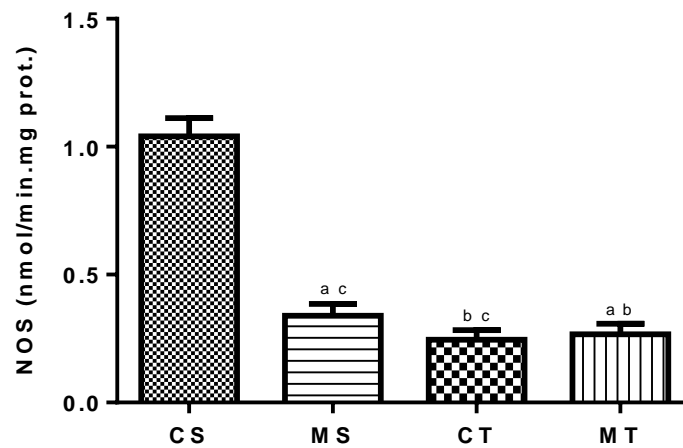


Figura 23. Atividade da NOS (nmol/min/mg prot.) em homogeneizado de pulmão. CS= controle sedentário; MS= monocrotalina sedentário; CT= controle treinado; MT= monocrotalina treinado. Valores representam média \pm DP. $n = 5 - 7$ animais por grupo. ^a $P < 0,05$ em comparação com os grupos controles (CS e CT). ^b $P < 0,05$ em comparação com os grupos sedentários (CS e MS). ^c $P < 0,05$ em comparação com o grupo controle sedentário (CS).

5.5.4.3 Imunoconteúdo da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS)

A enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), uma das isoformas mais importantes envolvidas na formação de NO endógeno, não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais analisados (figura 24).

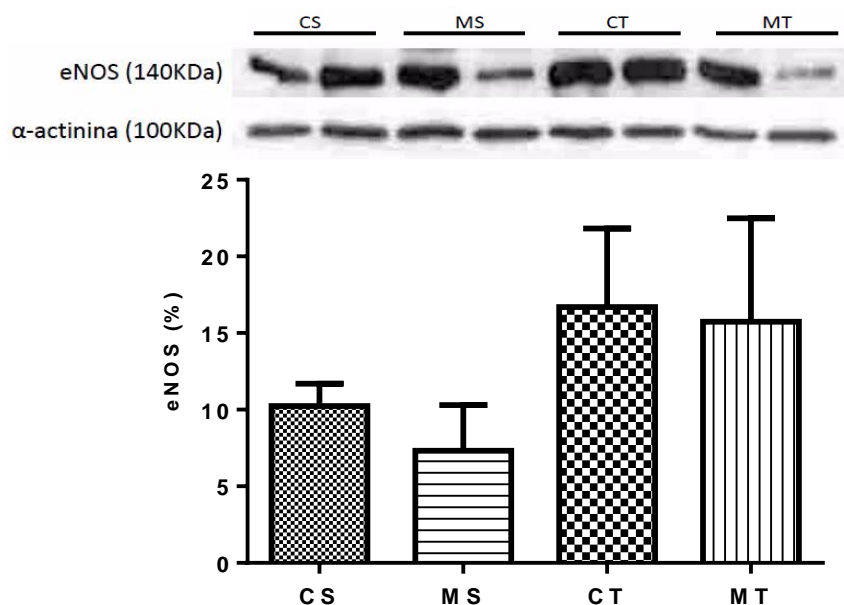


Figura 24. Imunoconteúdo da eNOS (%) em homogeneizado pulmonar. CS= controle sedentário; MS= monocrotalina sedentário; CT= controle treinado; MT= monocrotalina treinado. Valores representam média± DP. n= 4 animais por grupo. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais analisados.

5.5.4.4 Presença de marcação para iNOS

A marcação da iNOS apresentou as seguintes evidências, apresentadas na tabela 7 e na figura 25: os grupos controles (CS e CT) apresentaram 100% marcação ausente para essa enzima, enquanto que o grupo MS apresentou 43% ausente e 57% moderado e, o grupo MT evidenciou 17% ausente, 67% moderado e 17% acentuado.

Tabela 7. Marcação de iNOS em pulmão esquerdo.

iNOS (%)	CS	MS	CT	MT
Ausente (0)	100	43	100	17
Leve (1)	0	0	0	0
Moderado (2)	0	57	0	67
Acentuado (3)	0	0	0	17

Variáveis categóricas foram analisadas por descrição da frequência relativa: Grau 0 (ausente), grau 1 (leve), grau 2 (moderado) e grau 3 (acentuado).

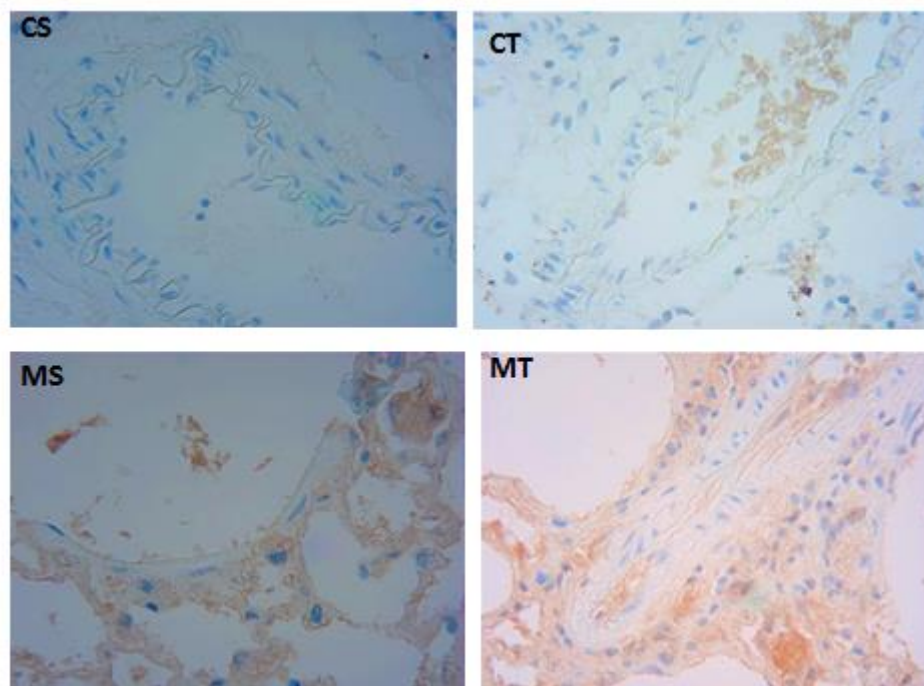


Figura 25. Imunohistoquímica para o marcador iNOS em arteríola pulmonar (ampliação de 400x). CS: controle sedentário; MS: monocrotalina sedentário; CT: controle treinado; MT: monocrotalina treinado.

5.5.4.5 Presença de marcação para nitrotirosina

Em relação a marcação da nitrotirosina, foram encontrados os seguintes resultados: o grupo CS teve 50% marcação ausente e 50% leve, enquanto o grupo MS teve 14% ausente, 14% leve, 14% acentuado e 57% acentuado. Os animais do grupo CT apresentaram por sua vez, 80% ausente e 20% marcação leve de nitrotirosina. Já os animais do grupo MT tiveram marcação acentuada de 67%, 17% leve e 17% moderada. Esses dados estão expressos na tabela 8 e representados na figura 26.

Tabela 8. Marcação de nitrotirosina em pulmão esquerdo.

<i>Nitrotirosina</i> (%)	CS	MS	CT	MT
Ausente	50	14	80	0
Leve	50	14	20	17
Moderado	0	14	0	17
Acentuado	0	57	0	67

Variáveis categóricas foram analisadas por descrição da frequência relativa: Grau 0 (ausente), grau 1 (leve), grau 2 (moderado) e grau 3 (acentuado).

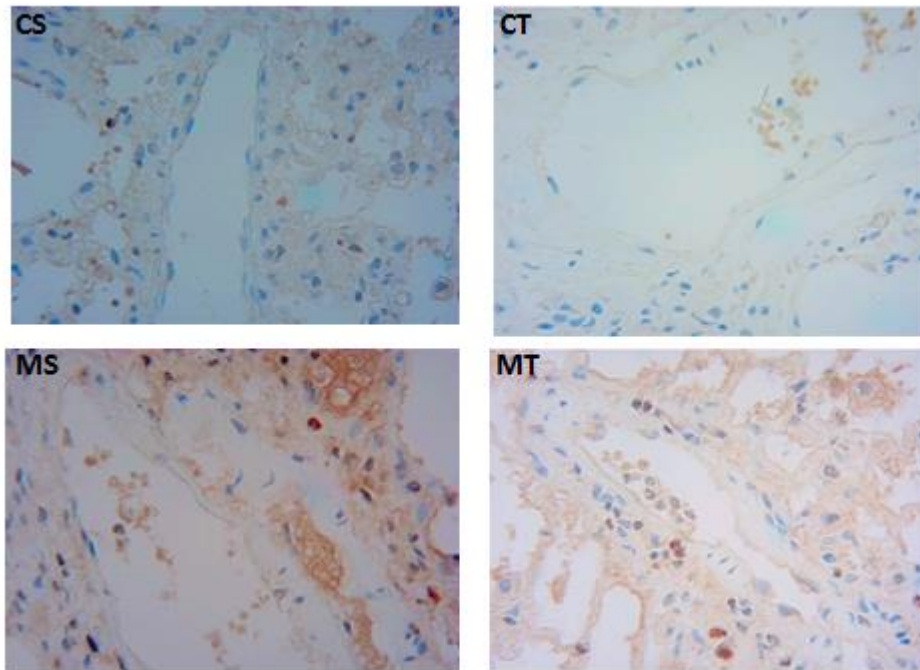


Figura 26. Imunohistoquímica para o marcador nitrotirosina em arteríola pulmonar (ampliação de 400x). CS: controle sedentário; MS: monocrotalina sedentário; CT: controle treinado; MT: monocrotalina treinado.

5.5.5 Metabolismo da ET-1

5.5.5.1 Imunoconteúdo do receptor A da endotelina-1 (ET-A)

Em relação ao receptor A da ET-1, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais (figura 27).

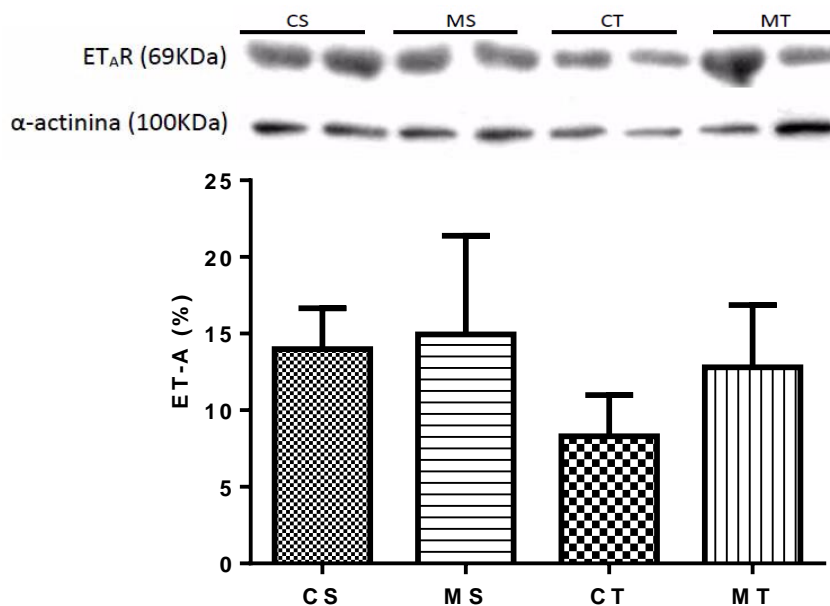


Figura 27. Imunoconteúdo do receptor A da ET-1 (ET-A) em homogeneizado pulmonar. CS= controle sedentário; MS= monocrotalina sedentário; CT= controle treinado; MT= monocrotalina treinado. Valores representam média \pm DP. 4 animais por grupo. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos analisados.

5.5.5.2 Imunoconteúdo do receptor B da endotelina-1 (ET-B)

Em relação ao imunoconteúdo da expressão desse receptor, responsável pelo efeito de vasodilatação e depuração da ET-1, o resultado evidencia uma redução na expressão nos grupos MS e MT quando comparados aos seus respectivos controles (figura 28).

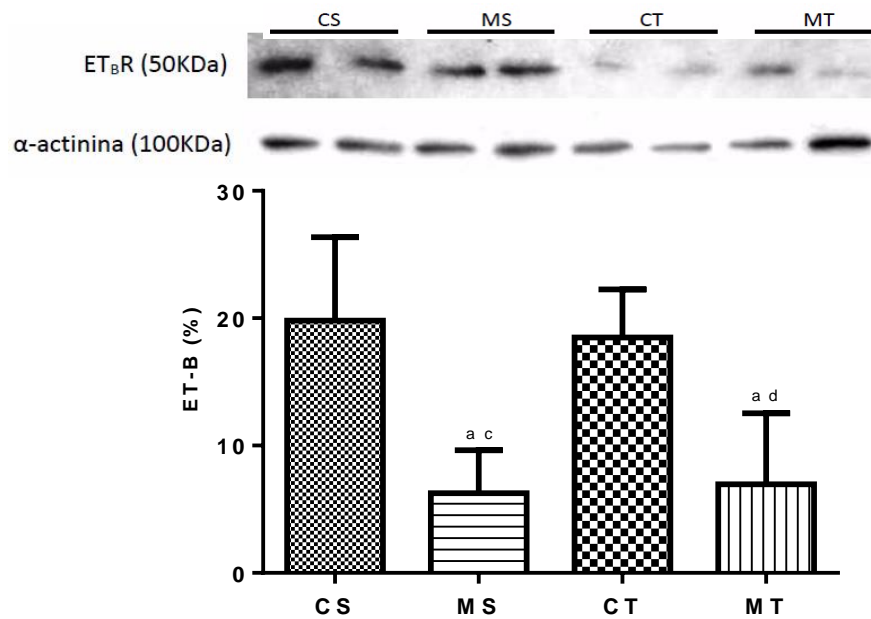


Figura 28. Imunoconteúdo do receptor B da ET-1 (ET-B) em homogeneizado pulmonar. CS= controle sedentário; MS= monocrotalina sedentário; CT= controle treinado; MT= monocrotalina treinado. Valores representam média \pm DP. n= 4 animais por grupo. ^aP<0,05 em comparação com os grupos controles (CS e CT). ^cP<0,05 em comparação com o grupo controle sedentário (CS).

6 DISCUSSÃO

A partir do nosso conhecimento sobre a literatura atual, esse é um dos precursores estudos que avaliou os efeitos do exercício físico aeróbio sobre o metabolismo do NO e da ET-1 no parênquima pulmonar de ratos com HAP induzida por MCT.

A HAP é uma patologia marcada pela alta mortalidade, etiologia variada e por grande prevalência. É caracterizada por vasoconstrição e remodelamento vascular pulmonar (BOGAARD et al., 2009), que frequentemente envolve a obstrução completa dos vasos levando a um aumento na resistência vascular (TUDER et al., 2009). Desde as primeiras observações dos mecanismos de toxicidade dos alcaloides pirróis, em 1960, a MCT tem se destacado como modelo experimental para estudo da HAP e do *Cor pulmonale*, uma vez que provoca alterações similares às encontradas na HAP humana, e todas as alterações acima citadas, são essenciais para confirmar o modelo de HAP induzido pela MCT (LALICH et al., 1961; KAY; HARRIS; HEATH, 1967; WERCHAN, 1989). No presente estudo, foram utilizados ratos machos, com a administração única intraperitoneal de 60 mg/Kg de MCT, dose esta capaz de induzir as alterações anteriores, evidenciando a eficácia no desenvolvimento de HAP e ICD, assim como visto em estudos prévios (KASAHARA et al., 1997; FARAHMAND; SINGAL; HILL, 2004; LOPES et al., 2008; GOMEZ-ARROYO et al., 2012).

Um dado importante que caracteriza esse modelo é a diminuição significativa no ganho de massa corporal nos animais que receberam a injeção de MCT. No final do protocolo experimental, os grupos MS e MT, que receberam a droga, tiveram ganho de massa significativamente menor do que os grupos CS e CT, respectivamente. Essa redução no ganho de peso é consequência da toxicidade gerada pelo metabolismo hepático nas primeiras semanas e, posteriormente, pelo prejuízo da capacidade ventilatória apresentada pelos animais que receberam MCT (MCNABB e BALDWIN, 1984). Vários estudos encontrados na literatura, que utilizaram MCT como modelo indutor de HAP e ICD, obtiveram esses mesmos resultados de redução do ganho de massa corporal (AHN et al., 2003; ZAMBELLI et al., 2011; COLOMBO et al., 2013; MOREIRA-GONÇALVEZ et al., 2015). Durante as três primeiras semanas do nosso protocolo experimental, observou-se que o exercício físico aeróbio esteve impedindo a perda de peso, uma vez que percebeu-se que os animais do grupo MT continuaram a

ganhar peso. Porém, no final da última semana de protocolo, evidenciamos uma mudança de efeito do exercício físico, uma vez que os animais do grupo MT tiveram uma maior redução do peso corporal, quando realizamos uma comparação no último dia de protocolo experimental, com o grupo MS, sugerindo dessa forma, um possível efeito potencializador na função da MCT sobre a massa corporal. Acreditamos que esse efeito tenha decorrido em resposta a uma maior severidade da doença nesses animais.

A redução no ganho de peso nos animais dos grupos que receberam a MCT foi acompanhada de outros sintomas clássicos desse modelo experimental, tais como, letargia, cianose, modificação na coloração da pelagem e dispneia.

Além dessas alterações, observamos também o desenvolvimento de hipertrofia ventricular direita (HVD) nos animais que receberam MCT, em relação aos seus controles. Essa hipertrofia compensatória seletiva do VD ocorre normalmente a partir do 21º dia após a indução da doença (HILL; JEDERLINIC; GAGNON, 1989; BERNOCCHI et al., 1996; DUMITRASCU, 2008). Sabe-se que o principal prognóstico na sobrevivência dos pacientes com HAP é decorrente da função do VD e, à medida que a doença progride, a HVD progride para dilatação mal adaptativa, insuficiência da valva tricúspide, desvio do septo interventricular, reduzindo a capacidade funcional (menor contratilidade) e, levando ao desenvolvimento de *Cor pulmonale*, seguido de óbito (VOELKEL, 2006; FRAZIER e BURKE, 2012). Mesmo sabendo há muito tempo o efeito do exercício físico na produção de hipertrofia cardíaca fisiológica (HCF) (MARON, 1986; DOUGLAS et al., 1997), não foram encontradas diferenças significativas na comparação dos grupos MS e MT, evidenciando dessa forma, que nesse protocolo experimental, o exercício físico aeróbio não foi capaz de alterar essa variável. Talvez, uma das possíveis explicações seja, o curto período de protocolo experimental, não sendo suficiente para ocasionar a HCF. Estudos anteriores realizados no nosso laboratório (SOUZA-RABBO et al., 2008; COLOMBO et al., 2013) e outros encontrados na literatura (HANDOKO et al., 2009; MOREIRA-GONÇALVEZ et al., 2015; PACAGNELLI et al., 2016), verificaram o mesmo padrão de hipertrofia nos animais que receberam MCT e, ao mesmo tempo, ausência de alterações promovidas pelo exercício físico entre os esses dois grupos (MS e MT).

Uma das grandes limitações para essa doença é a inexistência na literatura, de protocolos específicos de treinamento aeróbio, tanto para modelos clínicos, quanto para modelos pré-clínicos. Nosso laboratório, emprega, pela ausência de equipamentos

específicos para avaliar o consumo direto de oxigênio, o teste de velocidade máxima, que tem como referência um estudo de Rodrigues et al., (2007), que correlacionou o consumo direto de oxigênio com o teste de velocidade máxima em ratos diabéticos com insuficiência cardíaca. A partir da realização desse teste, estabelecemos a intensidade do treinamento físico, realizando um teste no início e um no final da segunda semana do protocolo. Desta forma, foi mantido um controle sobre a intensidade que foi empregada durante as sessões de treinamento, conseguindo assim, garantir a eficácia do protocolo experimental.

Juntamente com esses desfechos, outras importantes alterações decorrentes da progressão da HAP são as congestões hepática e pulmonar. Essa última medida não foi realizada neste estudo, uma vez que os pulmões foram utilizados para as demais análises. No nosso estudo, não encontramos congestão hepática nos grupos que receberam MCT. Esses danos (hepático e pulmonar) são dependentes de inúmeros fatores que, englobam até mesmo as individualidades de resposta de cada animal à droga e, por isso, a literatura apresenta bastante controvérsia sobre essas alterações. Um estudo recente de 2016, realizado com ratos machos e com a mesma dose de MCT, não encontrou congestão hepática, corroborando com os nossos resultados (PACAGNELLI et al., 2016).

Tendo em vista os resultados apresentados até o momento – massa corporal e HVD–, esses achados confirmam que o modelo experimental de HAP, induzida pela MCT, foi efetivado nesse estudo.

Todos esses achados estão de acordo com os resultados obtidos pela análise de diversos parâmetros ecocardiográficos, realizados no último dia de protocolo experimental, a fim de verificar os efeitos do exercício físico aeróbio na patologia e, as alterações promovidas pela progressão da mesma no VD. Análises ecocardiográficas permanecem sendo o principal exame de avaliação não invasiva na HAP, da estrutura e da função do VD e são utilizadas como forma de monitoramento da progressão e resposta às terapias (GALIÈ et al., 2009; ALENCAR et al., 2014; EGUCHI et al., 2014). Cabe lembrar que as alterações provocadas ao nível de tecido pulmonar, deflagram mecanismos compensatórios no coração, essencialmente pelo VD. Vários parâmetros vêm sendo aprimorados com o objetivo de melhorar a estimativa da função ventricular direita. Um deles é a avaliação do TAPSE, que mostra a medida do deslocamento do anel da valva tricúspide durante a sístole. No nosso estudo, o valor do

TAPSE encontrava-se reduzido em ambos os grupos que receberam MCT (MS e MT). O parâmetro do DC também estava diminuído nos grupos MS e MT. Outros parâmetros, como a variação da área do VD entre a sístole e a diástole, chamada de FAC, também auxiliam na verificação da função desse ventrículo. Não foram encontradas diferenças significativas nesse parâmetro nos diferentes grupos experimentais. Outros dados que não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes grupos foram FEC, IPM e a razão E/A. Tanto na relação do TAC/TEJ, quanto no DC, houve redução dos valores nos grupos que receberam a droga, mas essa redução foi acentuada no grupo que participou do protocolo de treinamento físico. A partir desses resultados, notamos que o exercício físico aeróbio não foi capaz de reverter, nem de atenuar as alterações no VD induzidas pelo aumento da resistência pulmonar, e em alguns parâmetros, como citado anteriormente, o exercício físico aeróbio promoveu uma piora ainda mais acentuada.

Os nossos achados ecocardiográficos diferem dos encontrados por Colombo et al (2015), uma vez que os animais do grupo que receberam MCT e participaram do protocolo de treinamento tiveram manutenção dos parâmetros de DC, VS, TAPSE e aumento na FEC e da FAC, possivelmente associada ao aumento no sinal angiogênico e capilarização no VD. No estudo de Moreira-Gonçalvez et al (2015), que comparou o efeito cardioprotetor do treinamento precoce e tardio na função do VD, foi demonstrado que ambos os grupos MCT tiveram respostas benéficas, sendo mais significativa nos animais que participaram do treinamento precoce. Outro estudo, que avaliou o efeito cardioprotetor do exercício físico, através de um protocolo de treinamento preventivo (duas semanas de pré-treino, oito de treinamento, indução com MCT e mais três de treinamento) mostrou uma melhoria na função cardíaca nos animais tratados com MCT e treinados (PACAGNELLI et al., 2016). Porém, no estudo de Handoko et al (2009), que comparou o efeito do treinamento físico sobre duas doses de MCT (40 e 60 mg/Kg), foi visualizado que o grupo treinado, que recebeu a mesma dose que nós utilizamos no nosso protocolo experimental (60 mg/Kg), teve redução do DC do VD. Os dados relacionados às alterações promovidas pela realização de treinamento físico em animais com HAP encontram-se baseados, principalmente, no fato de que o exercício físico, nos exemplos benéficos, promoveu aumento na formação de novos vasos e alteração nos genes dos transportadores de cálcio e, com isso, melhorou a função contrátil do VD. Mesmo assim a divergência de dados nos mostra que ainda não

há um consenso na literatura sobre o efeito real do exercício físico na função e estrutura do VD, sendo necessário dessa forma, a realização de mais estudos. Dessa maneira, a partir dos nossos achados, notamos que o aumento da resistência pulmonar induzida pelas alterações no leito pulmonar gerada pela progressão da doença, não foi revertida pelo treinamento físico.

Alterações bioquímicas também são características da patogênese da HAP, frente às alterações promovidas pela patologia, tanto no leito pulmonar, quanto no coração. Dentre essas modificações pode-se citar a presença de estresse oxidativo (FARAHMAND; SINGAL; HILL, 2004;) e disfunção endotelial (HART, 1999). Como citado anteriormente, o estresse oxidativo é resultado de um desequilíbrio na produção de espécies reativas, sem necessariamente aumento na capacidade antioxidante (TSUTSUI et al.,2011), conduzindo à uma elevação consequente da geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (GERACI et al., 2001; MONTANI et al., 2014). A presença de altos níveis de estresse oxidativo na HAP já foi destacada em pulmões de pacientes (BOWERS et al., 2004; MITTAL et al., 2007; LI et al.,2008), em modelos pré-clínicos com MCT (MATHEW et al., 2002; FARAHMAND; SINGAL; HILL, 2004; SETA et al, 2011) e na ICD (REDOUT et al.,2007).

Com o intuito de analisar o papel do estresse oxidativo neste modelo animal e verificar como o exercício físico aeróbio poderia atuar sobre esse fenômeno no tecido pulmonar, nós avaliamos uma das principais fontes de produção de espécies reativas, a enzima NOX, a concentração de duas importantes espécies reativas, $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , e analisamos também, os principais sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos primários (SOD, CAT e GPx). Também foram avaliados danos oxidativos induzidos pelas espécies reativas aos lipídios e às proteínas.

A primeira espécie reativa formada a partir do metabolismo do oxigênio é o $O_2^{\cdot-}$. Na vasculatura pulmonar, o $O_2^{\cdot-}$ é gerado principalmente pelas enzimas da família das NOX e, está intimamente relacionado à disfunção e ao remodelamento vascular induzido por hipóxia (FRESQUET et al.,2006; MITAL et al.,2007), demonstrando seu papel na patogênese da HAP. A partir da análise da concentração de $O_2^{\cdot-}$ no parênquima pulmonar, verificamos um aumento acentuado na concentração dessa espécie reativa nos animais que receberam MCT (MS e MT). Esses dados corroboram a literatura que demonstra um aumento dessa espécie reativa de oxigênio tanto em modelos clínicos,

quanto em pré-clínicos de HAP (BRENNAN et al., 2003; ALP e CHANNON et al., 2004; LIU et al., 2006; TABIMA; FRIZZEL; GLADWIN, 2012; AGGARWAL et al., 2013; MONTANI et al., 2014) e, normalmente sua maior concentração está diretamente associada a uma menor disponibilidade de NO, devido a rápida reação entre o NO e o O_2^- e formação de ONOO $^-$. Encontramos, também, uma elevação mais pronunciada da concentração de O_2^- no grupo que recebeu a droga e que participou do treinamento físico (MT), quando este foi comparado ao grupo que recebeu a droga, mas não participou do treinamento físico (MS). Esse dado sugere que o exercício físico aeróbio, no final do protocolo experimental esteja estimulando a produção de espécies reativas nesses animais, potencializando assim, o efeito da MCT, acentuando a disfunção endotelial e, conseqüentemente, a progressão da doença.

A partir do O_2^- , ocorre a formação do H_2O_2 , reação esta catalisada pela enzima antioxidante SOD. O H_2O_2 é considerado uma importante espécie reativa, principalmente por apresentar meia vida longa e capacidade de difusão pelas membranas. Executa suas funções como molécula sinalizadora devido à sua alta estabilidade e ao seu papel oxidativo sobre grupamentos tióis de proteínas intracelulares. Nesse estudo, nós não evidenciamos alterações significativas na concentração de H_2O_2 entre os grupos experimentais, após a finalização do protocolo de treinamento físico. Estudos prévios do nosso laboratório e outros da literatura apresentam controvérsias sobre a concentração de H_2O_2 , em diferentes tecidos. Por exemplo, utilizando modelo de HAP induzida por MCT e protocolos experimentais de treinamento semelhantes, verificou-se aumento da concentração de H_2O_2 no músculo esquelético dos animais que receberam MCT, tanto sedentários, quanto treinados, em relação a seus grupos controles, além do que, no grupo que recebeu MCT e participou do protocolo de treinamento esse aumento foi ainda mais acentuado (BECKER et al., 2013). No VD dos animais do grupo que recebeu MCT e que não participou do treinamento, houve diminuição da concentração de H_2O_2 , sendo que esse efeito não ocorreu no grupo que recebeu MCT e participou do treinamento (COLOMBO et al., 2013). Outros estudos encontrados na literatura objetivando avaliar o efeito do exercício físico sobre a concentração de H_2O_2 , demonstraram que o exercício físico (corrida) promoveu redução da produção de H_2O_2 pelas mitocôndrias do coração (JUDGE et al., 2005) e que, o exercício de resistência, reduziu também a concentração de H_2O_2 no músculo esquelético (VENDITTI et al., 1999) dos animais treinados. Dessa forma,

percebe-se que os resultados da concentração e da produção de H_2O_2 são variados, dependendo do tecido, momento de análises e ainda, das próprias características individuais dos animais.

A partir desses dados, nota-se uma maior concentração de O_2^- (nos animais dos grupos que receberam MCT), sem alteração dos níveis de H_2O_2 . Para verificar a produção desse aumento da concentração de O_2^- avaliamos uma das fontes de espécies reativas, a NOX, considerada a principal geradora de O_2^- na vasculatura pulmonar durante a HAP, além de ser também responsável pela regulação da atividade de outras fontes de espécies reativas (FREY; USHIO-FUKAI; MALIK, 2009; AGGARWAL et al., 2013). A partir da nossa análise, não encontramos diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais na atividade da NOX em tecido pulmonar, sugerindo o envolvimento de outras fontes na produção de espécies reativas, principalmente nos animais dos grupos MS e MT, que apresentaram elevação na concentração de O_2^- .

É conhecido que o aumento ou a diminuição da concentração de espécies reativas de oxigênio podem exercer efeitos diferentes na estrutura vascular ou pulmonar (ROCIC et al., 2007), pois níveis normais de espécies reativas são essenciais para ocorrência de processos fisiológicos básicos, enquanto que elevação nesses níveis são prejudiciais, gerando principalmente danos oxidativos a DNA, lipídios e proteínas. Como já discutido previamente, durante o metabolismo energético regular, ocorre a produção natural de espécies reativas, que alteram constantemente o estado redox da célula. As células, por sua vez, apresentam enzimas (por exemplo: SOD, CAT e GPx) que promovem defesa antioxidante e que a protegem contra a ação das espécies reativas, mantendo a concentração dessas espécies em níveis normais. Como vimos até o momento, os grupos MS e MT apresentaram elevação nos níveis de O_2^- , o que nos faz acreditar que as atividades das enzimas antioxidantes estejam alteradas para tentar compensar essa elevação e, dessa forma, estabilizar o estado redox intracelular.

A primeira enzima a atuar é SOD, catalisando a conversão de O_2^- em H_2O_2 . A literatura aborda que todas as isoformas da SOD são expressas nos pulmões (AGGARWAL et al., 2013) e que podem sofrer alterações tanto na sua expressão, quanto na sua atividade. No nosso estudo, observamos redução da atividade dessa enzima antioxidante nos animais que participaram do protocolo de treinamento físico (CT e MT) e também não encontramos diferenças significativas entre os grupos

experimentais, através da análise da sua expressão por Western Blot. Pesquisas avaliando protocolos de treinamento físico sobre a atividade da enzima SOD foram realizados em sangue (SOUZA-RABBO et al., 2008) e homogeneizado de músculo esquelético (BECKER et al., 2013) e verificaram aumento da atividade da SOD nos animais que participaram do treinamento e dos animais que receberam a MCT, mais acentuadamente no grupo que recebeu a droga e participou do treinamento físico, respectivamente. A fim de determinar se o treinamento físico alterava a enzima SOD, Laughlin et al (1990), através de treinamento em esteira (2h/dia, 5x/sem, durante 12 semanas), não encontraram diferenças significativas, no músculo esquelético, entre os animais sedentários e treinados. Dados em tecido pulmonar, associando o efeito do exercício físico aeróbio na atividade da SOD são escassos na literatura. Um estudo que avaliou o efeito do suco de uva nos pulmões de ratos com HAP induzida por MCT verificou diminuição da SOD após o tratamento, independente da administração de MCT ou não (LÜDKE et al., 2010). No VD de ratos que receberam MCT, evidenciou-se redução da expressão da SOD (REDOUT et al., 2007). Dessa forma, mais uma vez percebeu-se que a atividade dessas enzimas são tecido e tempo dependentes. Assim, conforme os nossos achados, a diminuição da atividade nos grupos treinados associada à inalterada expressão da SOD, pode ter ocorrido por maior ação da enzima em tempos mais precoces e, talvez explique a manutenção de níveis semelhantes da concentração de H_2O_2 , uma vez que estes permaneceram constantes nos diferentes grupos experimentais. Outra possível explicação é que provavelmente o aumento do estresse oxidativo esteja inibindo a ação da SOD (TRAVACIO et al., 2000), principalmente nos animais do grupo MT e, por consequência, o exercício físico aeróbio acabou prejudicando o estado redox desses animais.

Outra importante linha de defesa antioxidante analisada neste estudo foi a atividade e expressão da enzima CAT, responsável por catalisar a decomposição de H_2O_2 à H_2O e O_2 . Normalmente, essa enzima atua de forma mais efetiva na presença de altas concentrações de espécies reativas (H_2O_2) e sua atividade e expressão, assim como a enzima SOD, também sofre variações. A literatura apresenta uma variedade de dados controversos sobre a atividade dessa enzima dependendo do tecido, patologia e tipo de tratamento. Em relação aos nossos achados, encontramos que os animais que receberam MCT (MT e MS) tiveram redução da atividade dessa enzima e, que o grupo MT teve aumento na expressão por meio da análise do imunocontéudo por Western Blot, sem

essa mesma elevação no grupo MS. Já foi demonstrado que, em modelos pré-clínicos de HAP, com utilização de MCT, houve aumento da atividade da CAT no pulmão desses animais (JIN et al., 2008; LÜDCKE et al., 2010). Existem dados controversos na literatura sobre o efeito do exercício na atividade dessa enzima. A maior parte avaliou esses efeitos no miocárdio e em outras patologias, sendo que poucos demonstraram aumentos nos animais que participaram do treinamento físico (HUSAIN, 2003), enquanto que o maior número de resultados não apresentou alteração dessa enzima (HAMILTON et al., 2003; TAYLOR, CICCOLO e STARNES, 2003). Na musculatura esquelética esses dados também são controversos, apresentando tanto diminuição da atividade da CAT em alguns estudos (LEEUEWENBURGH et al., 1994) como aumento (SEMIN et al., 2000). Neste estudo, percebemos, mais uma vez o exercício físico aeróbio não teve uma resposta benéfica capaz de modular ou até reverter essa diminuição da atividade da enzima CAT nos animais que receberam a droga. Sabendo que o H_2O_2 pode atuar ativando a eNOS a produzir NO e, a longo prazo, pode elevar a expressão do gene da eNOS (DRUMMOND et al., 2000; THOMAS; CHEN; KEANEY, 2002; CAI et al., 2004), bem como, sabendo que a CAT promove a conversão de H_2O_2 é possível notar que há um mecanismo de feedback entre essas três moléculas. É bem documentado na literatura que o NO e a CAT interagem rapidamente entre si, formando um complexo que culmina na redução de NO e na diminuição da atividade da CAT (BROWN, 1995; SCHENKEL et al., 2014). Dessa forma, parece que a redução da atividade da CAT nos grupos MCT possa estar envolvida com uma maior interação, previamente, com o NO e, conseqüentemente, com a inalterada concentração de H_2O_2 nesses dois grupos.

Até o momento nossos achados: aumento nas concentrações de $O_2^{\cdot-}$, manutenção dos níveis de H_2O_2 e NOX, diminuição da enzima SOD nos grupos treinados (CT e MT), redução da atividade da CAT nos grupos MCT (MS e MT) e aumento da expressão da CAT no grupo MT, denotam um desequilíbrio no estado redox desses animais, com elevação na concentração de espécies reativas e diminuição da atividade das enzimas antioxidantes.

Outra importante enzima antioxidante avaliada foi a GPx. Notamos um aumento na atividade dessa enzima nos animais que receberam MCT (MS e MT) e uma elevação ainda mais pronunciada no grupo que, além da droga, participou do protocolo de treinamento físico (MT). Essas elevações na GPx também foram encontradas em outros

estudos prévios utilizando MCT, em pulmão (JIN et al., 2008) e em VD (SOUZA-RABBO et al., 2008). Porém outros estudos que analisaram o efeito cardioprotetor do exercício físico relacionado à sua capacidade de eliminação de espécies reativas, no infarto, não evidenciaram alteração nos níveis de GPx no coração (HAMILTON et al., 2003; TAYLOR, CICCULO e STARNES, 2003). Acredita-se que os níveis elevados de GPx, principalmente no grupo MT, neste estudo, estejam tentando manter o estado redox e, deste modo, evitar danos oxidativos.

Para verificar o dano oxidativo provocado pela HAP induzida pela MCT, nós analisamos por meio da técnica de quimiluminescência, os danos a lipídios e, por meio da técnica de carbonilas, os danos a proteínas. Em ambos, surpreendentemente, encontramos reduções de danos nos grupos MCT (MS e MT), diferindo dos achados da literatura, que mostram que os animais que receberam MCT apresentam elevação de dano e que o exercício físico aeróbio não é capaz de alterar esse padrão (RADAK et al., 1999). Porém, segundo um estudo de Pereira et al., 1994, que analisou as atividades das enzimas antioxidantes em variados tecidos de ratos treinados e sedentários, encontrou uma relação inversa entre a lipoperoxidação e os níveis de GPx, em todos os tecidos analisados, inferindo que, existe relação inversa dessa enzima e o dano oxidativo dentro das células. Assim, podemos inferir, que o aumento dos níveis de GPx nos animais MCT, principalmente no grupo MT, estão relacionados com os menores níveis de dano nesses animais. Também temos que considerar que essas análises foram realizadas em tecido total (não isolado). Portanto a presença de outros tipos celulares, incluindo eritrócitos, pode estar envolvida com o aumento da atividade da GPx e, conseqüentemente, resultar em menor dano oxidativo, como observado nesses animais (MS e MT).

Dessa forma, possivelmente parte do dano oxidativo causado pela MCT, esteja sendo minimizado por ação da enzima GPx. Cabe ressaltar, no entanto, que ocorreu aumento na concentração de $O_2^{\cdot-}$ nesses animais e que o exercício físico aeróbio não teve efeito sobre a redução dessa produção, nem na sua eliminação.

Percebe-se então que o estresse oxidativo apresenta papel fundamental no desenvolvimento da HAP, uma vez que medeia a apoptose e, também, a disfunção endotelial nas células endoteliais vasculares (GROBE et al., 2006). Como a instalação da disfunção endotelial é caracterizada por uma menor disponibilidade de agentes

vasodilatadores (o foco deste trabalho foi o NO) e aumento da ação de agentes vasoconstritores (o foco deste trabalho foi a ET-1) (GRANTON e MORIC, 2008), esse desequilíbrio resulta em mudanças estruturais progressivas na artéria pulmonar que conduzem à ICD (LAI et al., 2014). A fim de compreendermos o efeito que um protocolo de exercício físico aeróbio teria sobre o metabolismo da ET-1 e do NO no parênquima pulmonar de ratos com HAP, avaliamos a disfunção endotelial por meio da análise da concentração de nitritos totais, atividade da enzima óxido nítrico sintase, expressão proteica da enzima eNOS e dos receptores da ET-1 (ET-A e ET-B) e por imuno-histoquímica a marcação de iNOS e nitrotirosina. Isso porque, se sabe que o exercício físico é capaz de atuar sobre o metabolismo desses dois principais mediadores envolvidos com a disfunção endotelial.

Na literatura, a redução da disponibilidade de NO, tanto em humanos (LAI et al., 2013; MONTANI et al., 2014), quanto em modelos pré-clínicos (KHOO et al., 2005; HSU et al., 2007; HU et al 2010) está relacionada diretamente com uma menor resposta vasodilatadora e é encarada como uma das principais alterações patológicas na HAP (OZTURK e UMA, 2010). O NO é considerado um regulador pleiotrópico, essencial para diversos processos biológicos, incluindo vasodilatação, anti-proliferação (LAI et al., 2014), efeito anti-trombótico (LAI et al., 2014) e imunidade mediada por macrófagos (LASKIN et al., 1994).

No nosso estudo, ao avaliarmos a expressão da enzima eNOS, não encontramos diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais. Como citado anteriormente, essa enzima é responsável pela síntese normal de NO, nas células endoteliais, através da conversão de L-arginina em L-citrulina e NO, na presença de cofatores (NADPH, oxigênio e BH₄) e substratos (L-arginina). Na HAP, ainda há uma controvérsia sobre a expressão da eNOS, uma vez que estudos mostraram aumento, diminuição (GIRGIS et al., 2005; LÜDKE et al., 2010; GOMEZ-ARROYO et al., 2012; AHMED et al., 2014) ou inalteração desses níveis (SETA et al., 2011). Pesquisas analisando o efeito do exercício físico mostraram, que, de forma aguda, o exercício físico é capaz de aumentar a isoforma eNOS em arteríolas de músculo esquelético (SUN et al., 1994) e em tecido aórtico (DELP e LAUGHLIN, 1997) e, quando realizado de forma crônica, os níveis de eNOS muitas vezes acabam não sendo alterados, como visto em ratos (KINGWELL et al 1997) e suínos (MC ALLISTER et al., 1996). Um estudo realizado por Park e Omi (2014), avaliando os efeitos de diferentes tipos de exercícios

na prevenção da disfunção endotelial de artérias e perda óssea em ratas ovariectomizadas encontrou que tanto a natação, quanto o treinamento em esteira aumentaram os níveis de eNOS nos animais que participaram do treinamento. Esses achados benéficos também foram encontrados em ratos machos idosos, que participaram de um protocolo de exercício físico (TANABE et al., 2003). A consistência de dados sugere que o efeito vasodilator do exercício físico ocorre, principalmente, quando há um quadro de disfunção endotelial previamente instalado. Estudos envolvendo o efeito do exercício físico aeróbio sobre a expressão da eNOS no parênquima pulmonar na HAP são escassos, o que dificultou a comparação com os nossos resultados. Ao verificarmos a concentração de nitritos totais, um dos metabólitos do NO, não encontramos diferenças significativas entre os diferentes grupos. Por ser uma medida indireta, o aumento ou diminuição de nitritos, pode não significar aumento ou redução de disponibilidade de NO, uma vez que esse metabólito é originado por meio de diversas reações, além de poder interagir com outros compostos como aminas, por exemplo, gerando nitrosaminas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Na atividade da enzima NOS, percebemos redução tanto nos grupos que participaram do treinamento (CS e CT), quanto naqueles que receberam MCT, não havendo diferença entre os grupos MS e MT, quando estes foram comparados entre si.

Através desses dados, inferimos que a menor produção de NO decorrente de uma menor atividade da NOS indica possível alteração do metabolismo normal do NO, apresentando uma menor biodisponibilidade de NO e que, como já foi citado anteriormente, é uma das consequências da doença. Também, a inalteração da atividade da NOX pode indicar possível desacoplamento da enzima eNOS, uma vez que sua presença é determinante por ser um co-fator, conduzindo para a produção de $O_2^{\cdot-}$, ao invés de NO. Ao final do protocolo de treinamento aeróbio, visualizamos que este não foi eficaz para modificar o padrão de redução de NO na HAP, como se esperava.

Associados a esses achados, confirmamos, através das análises de imunohistoquímica, elevações nos níveis da enzima iNOS nos pulmões dos animais que receberam MCT. Como a ativação da isoforma iNOS ocorre em condições inflamatórias e difere das demais isoformas pela alta produção de NO, isto resulta em uma ação citotóxica, envolvendo a formação de $ONOO^-$, através da associação do NO produzido em excesso, pela ativação dos macrófagos, com o $O_2^{\cdot-}$. Aumentos na formação de $ONOO^-$ pulmonar estiveram relacionados com o desenvolvimento de HAP induzida por

hipóxia e, com o comprometimento funcional das células do epitélio pulmonar, além de contribuir para a progressão da HAP (KAMEZAKI et al., 2008). Esse dado sugere provavelmente que a maior concentração de $O_2^{\cdot -}$ encontrada nos animais que receberam MCT (MS e MT), possa estar interagindo com o NO produzido em excesso pela iNOS, levando à formação de $ONOO^-$, contribuindo para a progressão e severidade da doença. Dessa forma, acaba sendo instalado um ciclo vicioso que culmina na elevação de mais estresse oxidativo, além do que, esse NO pode ter previamente reagido com a CAT e, conseqüentemente, ter influenciado na sua menor atividade, como discutido previamente. Ambos os grupos controles (CS e CT) apresentaram 100% marcação ausente de iNOS, demonstrando a ausência de inflamação nesses animais. Os animais do grupo MS tiveram 57% marcação moderada de iNOS demonstrando uma grande prevalência dessa enzima, enquanto os animais do grupo MT apresentaram 67% de marcação moderada, evidenciando um aumento de 10% entre os dois grupos. Dessa forma, percebe-se que houve aumento na marcação da iNOS nos animais que receberam MCT, evidenciando um quadro clínico de inflamação, e que o treinamento físico aeróbio não foi eficaz como tratamento para manter ou reverter a ativação dessa enzima.

Normalmente, a elevação da enzima iNOS é acompanhada de aumento da concentração de nitrotirosina nos pulmões (PENG et al., 2005). Esse dado concorda com os resultados do nosso estudo, que evidenciaram aumentos nos níveis de iNOS, bem como, nos níveis de nitrotirosina nos animais que receberam MCT (MS e MT). O grupo MS teve 57% marcação acentuada na concentração de nitrotirosina, enquanto que o grupo MT teve 67% de marcação acentuada, mais uma vez evidenciando que o exercício físico aeróbio não foi capaz de reverter essa complicação da doença. A nitrotirosina, por ser um marcador da formação de $ONOO^-$, está diretamente associada com a formação de espécies reativas de nitrogênio. Já foram encontradas previamente elevações nos níveis de nitrotirosina em diversas patologias, incluindo HAP. Estudos pré-clínicos de HAP, induzida por MCT, evidenciaram aumento da iNOS e diminuição da eNOS (AHMED et al., 2014), bem como elevação nos níveis de nitrotirosina em tecido pulmonar (SETA et al., 2011). Devido à redução da disponibilidade de NO e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, caracterizadas pela associação de uma maior concentração de iNOS e nitrotirosina, ativação de cascatas proliferativas e inflamatórias são resultantes da progressão da doença (BHARGAVA et al., 1998; CROSSWHITE e SUN, 2010) e agravam a disfunção endotelial.

A partir de todos esses dados e sabendo que a ET-1 é o principal vasoconstritor derivado do endotélio, com importantes propriedades mitogênicas e proliferativas, tem-se, cada vez mais, relacionado alterações no seu metabolismo com a progressão da HAP. Isto porque a HAP é caracterizada por apresentar vasoconstrição sustentada, remodelamento vascular (hipertrofia e hiperplasia das células de músculo liso), redução do diâmetro do lúmen e aumento do tônus vascular, fatores estes, bastante evidenciados nos sintomas clássicos dos pacientes como limitação funcional, intolerância ao exercício físico e má qualidade de vida (ZAFRIR, 2013; MOCUMBI; THIENEMANN; SLIWA, 2015; SAHNI et al., 2015).

Vários estudos evidenciaram menor concentração de NO e elevação de ET-1 nessa patologia, tanto ao nível pulmonar, quanto plasmático (GIAID et al., 1993; STEWART et al., 1991). Foi também demonstrada alteração da ativação dos receptores da ET-1, com aumento da ativação dos receptores nas células musculares lisas e diminuição nas células endoteliais, evidenciando mais uma vez o importante efeito vasoconstritor efetuado pela ET-1 na doença (DAVIE et al., 2002; TABIMA et al., 2012). Interessante notar também que, os níveis de ET-1 em pacientes com HAP estão intimamente relacionados com a gravidade da doença, remodelamento pulmonar e com o prognóstico (STEWART et al., 1991; GIAID et al., 1993; RUBENS et al., 2001). O estudo de Miyauchi et al (1993), que avaliou a concentração de ET-1 no plasma no 6º, 10º, 14º, 18º e 25º dia após a indução com MCT, evidenciou aumento progressivo deste peptídeo que precedia o desenvolvimento da doença, sugerindo dessa forma um papel chave da ET-1 nessa patogênese.

Nossos resultados dos receptores da ET-1, não evidenciaram alteração do imunocontéudo do receptor ET-A em homogeneizado pulmonar, mas observamos reduções significativas do receptor ET-B nos grupos que receberam MCT (MS e MT). Esses dados corroboram a grande maioria dos achados encontrados na literatura que apresenta aumentos no receptor ET-A no VD de pacientes com HAP (NAGENDRAN et al., 2013; YU et al., 2013; KUC et al., 2014) e em tecido pulmonar (na camada média das artérias pulmonares médias) de animais com HAP induzida por MCT. A densidade do receptor ET-B, por sua vez, também esteve aumentada no VD de pacientes com HAP (KUC et al., 2014), mas em modelo experimental de MCT essa densidade ainda é controversa (MIYAUCHI et al 1993). Esses dados apresentam um maior efeito do receptor ET-A do que do ET-B, evidenciando assim, uma maior vasoconstrição, e

menor vasodilatação. Novamente, vimos que o exercício físico aeróbio não foi capaz de modular benéficamente o metabolismo da ET-1, pois não foram notadas diferenças entre os grupos treinados e os sedentários.

Para relacionar apenas o efeito do exercício físico aeróbio sobre as modificações produzidas nos parâmetros morfométricos, ecocardiográficos, bioquímicos e, também sobre o metabolismo do NO e da ET-1, nos animais que receberam MCT, elaboramos o seguinte esquema mostrado na tabela 9.

Tabela 9. Comparação geral entre os animais MS e MT.

Parâmetro	
Massa corporal final	MS > MT
HVD	MS = MT
Congestão Hepática	MS = MS
TAC/TEJ	MS > MT
VS	MS = MT
DC	MS > MT
TAPSE	MS = MT
O ₂ '	MS < MT
H ₂ O ₂	MS = MT
NOX	MS = MT
SOD (atividade)	MS > MT
CAT (atividade)	MS = MT
GPx (atividade)	MS < MT
QL	MS = MT
Carbonilas	MS = MT
eNOS (expressão)	MS = MT
NO ₂ ⁻	MS = MT
NOS (atividade)	MS = MT
iNOS	MS < MT
Nitrotirosina	MS < MT
ET-A	MS = MT
ET-B	MS = MT

Assim, da mesma maneira que não notamos alterações significativas induzidas pelo exercício, no metabolismo do NO e da ET-1, também não visualizamos alterações benéficas nos parâmetros ecocardiográficos e nas análises bioquímicas.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, o modelo experimental de HAP induzido por MCT, foi prontamente reproduzido nesse estudo e a realização do protocolo de treinamento físico mostrou-se incapaz de atenuar e/ou reverter as alterações no metabolismo do NO e da ET-1, bem como o aumento do estresse oxidativo causados pela droga. Na verdade, em muitas análises, foram encontrados efeitos prejudiciais do exercício físico aeróbio, potencializando a progressão e severidade da doença.

Não podemos concluir que o exercício físico seja algo prejudicial para pacientes com HAP, mas devemos salientar a importância de novos e mais estudos que visem a melhor compreensão do papel que o exercício físico aeróbio possui sobre essa doença.

Como limitação podemos sugerir que é possível que a intensidade do treinamento físico possa ter influenciado nos resultados negativos obtidos nesse protocolo experimental.

8 PERSPECTIVAS

- Medir a atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6DP), para verificar concentração de NADPH;
- Medir glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG);
- Avaliar outras fontes de espécies reativas, como a xantina oxidase (atividade e imunoconteúdo);
- Analisar a marcação de ET-1, ET-A, ET-B, gp91-phox e eNOS por imunohistoquímica;
- Verificar alterações do diâmetro e espessura da camada média da artéria pulmonar, por meio de análises histológicas.
- Avaliar o $VO_{2\text{máx}}$ no modelo de HAP induzida por MCT em ratos.

REFERÊNCIAS

ABE, Kohtaro et al. Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. **Circulation research**, v. 94, n. 3, p. 385-393, 2004.

ADAMS, V. et al. Impact of physical exercise training on the expression of NAD (P) H-oxidase and angiotensin-II receptors in the left mammalian artery of patients with coronary artery disease. In: **Circulation**. 530 WALNUT ST, PHILADELPHIA, PA 19106-3621 USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2002. p. 354-355.

AFANAS' EV, Igor. ROS and RNS signaling in heart disorders: could antioxidant treatment be successful?. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2011, 2011.

AGGARWAL, Saurabh et al. Reactive oxygen species in pulmonary vascular remodeling. **Comprehensive Physiology**, 2013.

AHMED, Lamiaa A. et al. Role of oxidative stress, inflammation, nitric oxide and transforming growth factor-beta in the protective effect of diosgenin in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **European journal of pharmacology**, v. 740, p. 379-387, 2014.

AHN, Byung Hoon 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, 2003.

ALENCAR, Allan KN et al. N-acylhydrazone derivative ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension through the modulation of adenosine AA2R activity. **International journal of cardiology**, v. 173, n. 2, p. 154-162, 2014.

ALEXANDER, S., Mathie, A. and Peters, J. (2011), Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition. British Journal of Pharmacology, 164: S1–S2. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01649_1.x

ALP, Nicholas J.; CHANNON, Keith M. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 24, n. 3, p. 413-420, 2004.

ALVES, Jose Leonidas et al. Pulmonary arterial hypertension in the southern hemisphere: results from a registry of incident Brazilian cases. **CHEST Journal**, v. 147, n. 2, p. 495-501, 2015.

ARAÚJO, 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, p. 133-139, 2006.

ARENA, Ross et al. The effect of exercise training on the pulmonary arterial system in patients with pulmonary hypertension. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 57, n. 5, p. 480-488, 2015.

ASSENDER, J. W.; IRENIUS, E.; FREDHOLM, B. B. Endothelin-1 causes a prolonged protein kinase C activation and acts as a co-mitogen in vascular smooth muscle cells. **Acta physiologica scandinavica**, v. 157, n. 4, p. 451-460, 1996.

- AUSTIN, Eric D. et al. Gender, sex hormones and pulmonary hypertension. **Pulmonary circulation**, v. 3, n. 2, p. 294-314, 2013.
- BADESCH, David B. et al. Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, n. 1s1, p. S55-S66, 2009.
- BADESCH, David B. et al. Medical therapy for pulmonary arterial hypertension: updated ACCP evidence-based clinical practice guidelines. **CHEST Journal**, v. 131, n. 6, p. 1917-1928, 2007.
- BARCLAY, A. R. et al. Pulmonary hypertension—a new manifestation of mitochondrial disease. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 28, n. 6, p. 1081-1089, 2005.
- BARRETO, Alessandra Costa et al. Hipertensão arterial pulmonar. Fisiopatologia, aspectos genéticos e resposta ao uso crônico do sildenafil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, n. 2, p. 147-154, 2005.
- BARTON, Matthias; YANAGISAWA, Masashi. Endothelin: 20 years from discovery to therapy This article is one of a selection of papers published in the special issue (part 2 of 2) on Forefronts in Endothelin. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 86, n. 8, p. 485-498, 2008.
- BECKER, Cristiano Urbano. Efeito do treinamento físico aeróbico sobre o estresse oxidativo na musculatura esquelética de ratos com hipertensão arterial pulmonar. 2013.
- BECKMAN, Joseph S.; KOPPENOL, Willem H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 271, n. 5, p. C1424-C1437, 1996.
- BERNOCCHI, Palmira et al. Skeletal muscle metabolism in experimental heart failure. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 28, n. 11, p. 2263-2273, 1996.
- BHARGAVA, A. et al. Monocrotaline induces interleukin-6 mRNA expression in rat lungs. **Heart disease (Hagerstown, Md.)**, v. 1, n. 3, p. 126-132, 1998.
- BOGAARD, Harm J. et al. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. **Chest Journal**, v. 135, n. 3, p. 794-804, 2009.
- BOULANGER, Chantal; LÜSCHER, T. F. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. **Journal of Clinical Investigation**, v. 85, n. 2, p. 587, 1990.
- BOVERIS, Alberto. [57] Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 429-435, 1984.
- BOVERIS, Alberto; CHANCE, Britton. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**, v. 134, n. 3, p. 707-716, 1973.
- BOWERS, Rebecca et al. Oxidative stress in severe pulmonary hypertension. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 169, n. 6, p. 764-769, 2004.

BRENNAN, Lisa A. et al. Increased Superoxide Generation Is Associated With Pulmonary Hypertension in Fetal Lambs A Role for NADPH Oxidase. **Circulation research**, v. 92, n. 6, p. 683-691, 2003.

BROWN, David A. et al. Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rat heart. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 6, p. 2510-2518, 2003.

BROWN, Guy C. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. **European Journal of Biochemistry**, v. 232, n. 1, p. 188-191, 1995.

BUDHIRAJA, Rohit; TUDER, Rubin M.; HASSOUN, Paul M. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 109, n. 2, p. 159-165, 2004.

CAI, Hua et al. Oscillatory shear stress upregulation of endothelial nitric oxide synthase requires intracellular hydrogen peroxide and CaMKII. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 37, n. 1, p. 121-125, 2004.

CALABRESE, Edward J.; BALDWIN, Linda A. Defining hormesis. **Human & experimental toxicology**, v. 21, n. 2, p. 91-97, 2002.

CALLOU, Marlene Rau de Almeida; RAMOS, Paulo Roberto Miranda. 16. Hipertensão arterial pulmonar. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, n. 6, p. 156-159, 2009.

CHATTERJEE, Anuran; CATRAVAS, John D. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. **Vascular pharmacology**, v. 49, n. 4, p. 134-140, 2008.

CHEN, S. J. et al. Endothelin-receptor antagonist bosentan prevents and reverses hypoxic pulmonary hypertension in rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 79, n. 6, p. 2122-2131, 1995.

CHENG, Tzu-Hung et al. Reactive oxygen species mediate cyclic strain-induced endothelin-1 gene expression via Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase pathway in endothelial cells. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 33, n. 10, p. 1805-1814, 2001.

CHESTER, Adrian H. et al. Influence of endothelin on human coronary arteries and localization of its binding sites. **The American journal of cardiology**, v. 63, n. 18, p. 1395-1398, 1989.

CHIN, Kelly M.; RUBIN, Lewis J. Pulmonary arterial hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 51, n. 16, p. 1527-1538, 2008.

COLOMBO, Rafael et al. Aerobic Exercise Promotes a Decrease in Right Ventricle Apoptotic Proteins in Experimental Cor Pulmonale. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 66, n. 3, p. 246-253, 2015.

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

CORBIN, Jackie D. et al. High lung PDE5: a strong basis for treating pulmonary hypertension with PDE5 inhibitors. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 334, n. 3, p. 930-938, 2005.

CRABTREE, Mark J. et al. Ratio of 5, 6, 7, 8-tetrahydrobiopterin to 7, 8-dihydrobiopterin in endothelial cells determines glucose-elicited changes in NO vs. superoxide production by eNOS. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 294, n. 4, p. H1530-H1540, 2008.

CROSSWHITE, Patrick; SUN, Zhongjie. Nitric oxide, oxidative stress and inflammation in pulmonary arterial hypertension. **Journal of hypertension**, v. 28, n. 2, p. 201, 2010.

DAI, Zen-Kong et al. Effects of sildenafil on pulmonary hypertension and levels of ET-1, eNOS, and cGMP in aorta-banded rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 231, n. 6, p. 942-947, 2006.

DALLA LIBERA, Luciano et al. Apoptosis and atrophy in rat slow skeletal muscles in chronic heart failure. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 277, n. 5, p. C982-C986, 1999.

DAUSSIN, Frédéric N. et al. Training at high exercise intensity promotes qualitative adaptations of mitochondrial function in human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 5, p. 1436-1441, 2008.

DAVIE, Neil et al. ETA and ETB receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 165, n. 3, p. 398-405, 2002.

DE NUCCI, Gilberto et al. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 24, p. 9797-9800, 1988.

DE SOUZA RABBO, Maristela Padilha. **Efeitos do Treinamento Físico no Perfil Hemodinâmico e no Estresse Oxidativo em modelo experimental de Cor pulmonale**. 2005. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DELP, MICHAEL D.; LAUGHLIN, M. HAROLD. Time course of enhanced endothelium-mediated dilation in aorta of trained rats. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 29, n. 11, p. 1454-1461, 1997.

DELP, MICHAEL D.; MCALLISTER, RICHARD M.; LAUGHLIN, M. HAROLD. Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. **Journal of Applied Physiology**, v. 75, n. 3, p. 1354-1363, 1993.

DEMARCO, V.G et al. Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial Hypertension. **World Journal of Cardiology**. Vol. 2 (10), p.316-24, 2010.

DIAS-JUNIOR, Carlos Alan; CAU, Stefany Bruno de Assis; TANUS-SANTOS, José Eduardo. Role of nitric oxide in the control of the pulmonary circulation: physiological, pathophysiological, and therapeutic implications. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 6, p. 412-419, 2008.

DINH-XUAN, A. T. Endothelial modulation of pulmonary vascular tone. **European Respiratory Journal**, v. 5, n. 6, p. 757-762, 1992.

DOUGLAS, Pamela S. et al. Left ventricular hypertrophy in athletes. **The American journal of cardiology**, v. 80, n. 10, p. 1384-1388, 1997.

DRÖGE, Wulf. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DRUMMOND, Grant R. et al. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. **Circulation research**, v. 86, n. 3, p. 347-354, 2000.

DUMITRASCU, Rio et al. Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury. **BMC pulmonary medicine**, v. 8, n. 1, p. 1, 2008.

DUPUIS, Jocelyn et al. Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. **Circulation**, v. 94, n. 7, p. 1578-1584, 1996.

EGUCHI, Masamichi et al. Adipose-derived regenerative cell therapy inhibits the progression of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **Life sciences**, v. 118, n. 2, p. 306-312, 2014.

EGUCHI, Satoru et al. Endothelin receptor subtypes are coupled to adenylate cyclase via different guanyl nucleotide-binding proteins in vasculature. **Endocrinology**, v. 132, n. 2, p. 524-529, 1993.

EMOTO, Noriaki; YANAGISAWA, Masashi. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 25, p. 15262-15268, 1995.

ENACHE, Irina et al. Skeletal muscle mitochondrial dysfunction precedes right ventricular impairment in experimental pulmonary hypertension. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 373, n. 1-2, p. 161-170, 2013.

FAGAN, Karen A. et al. The pulmonary circulation of homozygous or heterozygous eNOS-null mice is hyperresponsive to mild hypoxia. **The Journal of clinical investigation**, v. 103, n. 2, p. 291-299, 1999.

FARBER, Harrison W.; LOSCALZO, Joseph. Pulmonary arterial hypertension. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 16, p. 1655-1665, 2004.

FARHAT, Michel 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. 719-723, 1993.

FÉLÉTOU, Michel; VANHOUTTE, Paul M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (the Wiggers Award Lecture). **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 3, p. H985-H1002, 2006.

FERREIRA, Filipe; FERREIRA, Rita; DUARTE, José Alberto. Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. **Revista Portuguesa de ciências do desporto**, v. 7, n. 2, p. 257-275, 2007.

FLECHA, Beatriz Gonzalez; LLESUY, Susana; BOVERIS, Alberto. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 10, n. 2, p. 93-100, 1991.

FLOHÉ, Leopold; GÜNZLER, Wolfgang A. [12] Assays of glutathione peroxidase. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 114-120, 1984.

FÖRSTERMANN, Ulrich; MÜNZEL, Thomas. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease from marvel to menace. **Circulation**, v. 113, n. 13, p. 1708-1714, 2006.

FRASCH, H. Frederick; MARSHALL, Carol; MARSHALL, Bryan E. Endothelin-1 is elevated in monocrotaline pulmonary hypertension. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 276, n. 2, p. L304-L310, 1999.

FRAZIER, Aletta Ann; BURKE, Allen P. The imaging of pulmonary hypertension. In: **Seminars in Ultrasound, CT and MRI**. WB Saunders, 2012. p. 535-551.

FRESQUET, Fleur et al. Role of reactive oxygen species and gp91phox in endothelial dysfunction of pulmonary arteries induced by chronic hypoxia. **British journal of pharmacology**, v. 148, n. 5, p. 714-723, 2006.

FREY, Randall S.; USHIO-FUKAI, Masuko; MALIK, Asrar B. NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysiology. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 4, p. 791-810, 2009.

FUKAI, Tohru et al. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. **The Journal of clinical investigation**, v. 105, n. 11, p. 1631-1639, 2000.

FUKURODA, Takahiro et al. Clearance of circulating endothelin-1 by ET B receptors in rats. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 199, n. 3, p. 1461-1465, 1994.

FURCHGOTT, Robert F. et al. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.

GALIE, N. et al. Relation of endothelin-1 to survival in patients with primary pulmonary hypertension. **Eur J Clin Invest**, v. 26, n. suppl 1, p. 273, 1996.

GALIÈ, Nazzareno et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. **European heart journal**, v. 30, n. 20, p. 2493-2537, 2009.

GALIÈ, Nazzareno; PALAZZINI, Massimiliano; MANES, Alessandra. Pulmonary arterial hypertension: from the kingdom of the near-dead to multiple clinical trial meta-analyses. **European heart journal**, p. ehq152, 2010.

GERACI, Mark W. et al. Gene Expression Patterns in the Lungs of Patients With Primary Pulmonary Hypertension A Gene Microarray Analysis. **Circulation Research**, v. 88, n. 6, p. 555-562, 2001.

GIAID, Adel et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. **New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 24, p. 1732-1739, 1993.

GIAID, Adel; SALEH, Dina. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. **New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 4, p. 214-221, 1995.

GIANNESSI, D.; DEL RY, S.; VITALE, R. L. The role of endothelins and their receptors in heart failure. **Pharmacological research**, v. 43, n. 2, p. 111-126, 2001.

GIRGIS, Reda E. et al. Decreased exhaled nitric oxide in pulmonary arterial hypertension: response to bosentan therapy. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 172, n. 3, p. 352-357, 2005.

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

GOTO, Chikara et al. Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. **Circulation**, v. 108, n. 5, p. 530-535, 2003.

GRANGER, Donald L. et al. [6] Measuring nitric oxide production in human clinical studies. **Methods in enzymology**, v. 301, p. 49-61, 1999.

GRANTON, John; MORIC, Jakov. Pulmonary vasodilators—treating the right ventricle. **Anesthesiology clinics**, v. 26, n. 2, p. 337-353, 2008.

GROBE, Albert C. et al. Increased oxidative stress in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension: role of NADPH oxidase and endothelial NO synthase. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 290, n. 6, p. L1069-L1077, 2006.

GROEPENHOFF, Herman et al. Prognostic relevance of changes in exercise test variables in pulmonary arterial hypertension. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e72013, 2013.

GROSS, Steven S. Nitric oxide synthases and their cofactors. In: **Nitric Oxide and the Kidney**. Springer US, 1997. p. 52-65.

HADDAD, François et al. Right ventricular function in cardiovascular disease, Part II pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. **Circulation**, v. 117, n. 13, p. 1717-1731, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in medicine and biology. **Clarendon: Oxford**, 1999.

HALLIWELL, Barry. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). **Free radical research**, v. 31, n. 4, p. 261-272, 1999.

HALLIWELL, Barry. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v. 355, n. 9210, p. 1179-1180, 2000.

HAMBRECHT, Rainer et al. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. **Circulation**, v. 98, n. 24, p. 2709-2715, 1998.

HAMILTON, Karyn L. et al. Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 7, p. 800-809, 2003.

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

HART, C. Michael. Nitric oxide in adult lung disease. **CHEST Journal**, v. 115, n. 5, p. 1407-1411.

HAYNES, William G.; WEBB, David J. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. **Journal of hypertension**, v. 16, n. 8, p. 1081-1098, 1998.

HENSLEY, Kenneth; WILLIAMSON, Kelly S.; FLOYD, Robert A. Measurement of 3-nitrotyrosine and 5-nitro- γ -tocopherol by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 4, p. 520-528, 2000.

HESSEL, Marleen HM et al. Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. **American journal of physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 5, p. H2424-H2430, 2006.

HILL, NICHOLAS S.; JEDERLINIC, PETER; GAGNON, JAMES. Supplemental oxygen reduces right ventricular hypertrophy in monocrotaline-injected rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 66, n. 4, p. 1642-1648, 1989.

HOORN, C. M.; ROTH, R. A. Monocrotaline pyrrole alters DNA, RNA and protein synthesis in pulmonary artery endothelial cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 262, n. 6, p. L740-L747, 1992.

HORINOUCHI, Takahiro et al. Endothelin receptor signaling: new insight into its regulatory mechanisms. **Journal of pharmacological sciences**, v. 123, n. 2, p. 85-101, 2013.

HOWARD, Paisley G.; PLUMPTON, Christopher; DAVENPORT, Anthony P. Anatomical localization and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue. **Journal of hypertension**, v. 10, n. 11, p. 1379-1386, 1992.

HSU, Lewis L. et al. Hemolysis in sickle cell mice causes pulmonary hypertension due to global impairment in nitric oxide bioavailability. **Blood**, v. 109, n. 7, p. 3088-3098, 2007.

HU, Weiguo et al. The critical roles of platelet activation and reduced NO bioavailability in fatal pulmonary arterial hypertension in a murine hemolysis model. **Blood**, v. 116, n. 9, p. 1613-1622, 2010.

HUMBERT, Marc et al. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. **Circulation**, v. 122, n. 2, p. 156-163, 2010.

HUSAIN, Kazim. Interaction of physical training and chronic nitroglycerin treatment on blood pressure, nitric oxide, and oxidants/antioxidants in the rat heart. **Pharmacological research**, v. 48, n. 3, p. 253-261, 2003.

HUYNH, Ngan Ngoc; CHIN-DUSTING, Jaye. Amino acids, arginase and nitric oxide in vascular health. **Clinical and experimental pharmacology and physiology**, v. 33, n. 1-2, p. 1-8, 2006.

IGNARRO, L J. LUN W. Nitric oxide in the regulation of vascular function: an historical overview. **Journal of cardiac surgery**, v. 17, n. 4, p. 301-306, 2001.

- ISHIKAWA, Tomohisa et al. Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide. **Pfluegers Archiv**, v. 413, n. 1, p. 108-110, 1988.
- ISHIKAWA, TOMOHISA et al. Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 255, n. 4, p. H970-H973, 1988.
- JANSA, Pavel et al. Epidemiology and long-term survival of pulmonary arterial hypertension in the Czech Republic: a retrospective analysis of a nationwide registry. **BMC pulmonary medicine**, v. 14, n. 1, p. 1, 2014.
- JARDIM, José Roberto; NASCIMENTO, Oliver A. Epidemiologia, impacto e tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) no Brasil. **Revista Racine**, v. 101, p. 32-47, 2007.
- JOHNSON, Lynelle R.; LAUGHLIN, M. Harold. Chronic exercise training does not alter pulmonary vasorelaxation in normal pigs. **Journal of Applied Physiology**, v. 88, n. 6, p. 2008-2014, 2000.
- JUDGE, Sharon et al. Exercise by lifelong voluntary wheel running reduces subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial hydrogen peroxide production in the heart. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 289, n. 6, p. R1564-R1572, 2005.
- KAMEZAKI, Fumihiko et al. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase ameliorates pulmonary hypertension in rats. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 177, n. 2, p. 219-226, 2008.
- KASAHARA, Yasunori et al. Bioactivation of monocrotaline by P-450 3A in rat liver. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 124-129, 1997.
- KATUSIC, Zvonimir S.; D'USCIO, Livius V.; NATH, Karl A. Vascular protection by tetrahydrobiopterin: progress and therapeutic prospects. **Trends in pharmacological sciences**, v. 30, n. 1, p. 48-54, 2009.
- KAY, J. Michael; HARRIS, Peter; HEATH, Donald. Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. **Thorax**, v. 22, n. 2, p. 176-179, 1967.
- KAY, John Michael; HEATH, Donald. **Crotalaria spectabilis: the pulmonary hypertension plant**. CC Thomas, 1969.
- KHOO, Jeffrey P. et al. Pivotal role for endothelial tetrahydrobiopterin in pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 111, n. 16, p. 2126-2133, 2005.
- KINGWELL, Bronwyn A. et al. Spontaneous running increases aortic compliance in Wistar-Kyoto rats. **Cardiovascular research**, v. 35, n. 1, p. 132-137, 1997.
- KOSOGOF, Christi; TEPE, Jetze J.; WILLIAMS, Robert M. DNA cross-linking by a phototriggered pyrrolic progenitor developed from monocrotaline. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 38, p. 6641-6643, 2001.
- KUC, Rhoda E. et al. Modulation of endothelin receptors in the failing right ventricle of the heart and vasculature of the lung in human pulmonary arterial hypertension. **Life sciences**, v. 118, n. 2, p. 391-396, 2014.

LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAI, Yen-Chun et al. Pulmonary Arterial Hypertension The Clinical Syndrome. **Circulation research**, v. 115, n. 1, p. 115-130, 2014.

LALICH, J. J. et al. Pulmonary arteritis produced in rats by feeding *Crotalaria spectabilis*. **Laboratory Investigation**, v. 10, p. 744-750, 1961.

LAMÉ, Michael W. et al. Protein targets of monocrotaline pyrrole in pulmonary artery endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 37, p. 29091-29099, 2000.

LANDINO, Lisa M. et al. Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 26, p. 15069-15074, 1996.

LANE, Paul; GROSS, Steven S. Cell signaling by nitric oxide. In: **Seminars in nephrology**. 1999. p. 215-229.

LASKIN, Jeffrey D.; HECK, Diane E.; LASKIN, Debra L. Multifunctional role of nitric oxide in inflammation. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 5, n. 9, p. 377-382, 1994.

LAUGHLIN, M. H. et al. Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training. **Journal of Applied Physiology**, v. 68, n. 6, p. 2337-2343, 1990.

LEE, Jisun; GIORDANO, Samantha; ZHANG, Jianhua. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. **Biochemical Journal**, v. 441, n. 2, p. 523-540, 2012.

LEEUEWENBURGH, Chris et al. Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 267, n. 2, p. R439-R445, 1994.

LI, Shu et al. NOX4 regulates ROS levels under normoxic and hypoxic conditions, triggers proliferation, and inhibits apoptosis in pulmonary artery adventitial fibroblasts. **Antioxidants & redox signaling**, v. 10, n. 10, p. 1687-1698, 2008.

LIU, John 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-L10, 2006.

LIU, Songling et al. Endothelin-1 activates endothelial cell nitric-oxide synthase via heterotrimeric G-protein $\beta\gamma$ subunit signaling to protein kinase B/Akt. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 50, p. 49929-49935, 2003.

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. 241-249, 1985.

LOCKE, MARIUS et al. Enhanced postischemic myocardial recovery following exercise induction of HSP 72. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 269, n. 1, p. H320-H325, 1995.

LOPES, Francis da Silva et al. Down-regulation of MyoD gene expression in rat diaphragm muscle with heart failure. **International journal of experimental pathology**, v. 89, n. 3, p. 216-222, 2008.

LOWRY, O. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J biol Chem**, v. 193, p. 265-75, 1951.

LUDKE, Ana RL et al. Modulation of monocrotaline-induced cor pulmonale by grape juice. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 55, n. 1, p. 89-95, 2010.

LUSHCHAK, Volodymyr I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-biological interactions**, v. 224, p. 164-175, 2014.

MACNEE, W. The clinical importance of right ventricular function in pulmonary hypertension. **The diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. Futura, New York**, p. 13-40, 1992.

MAEDA, Seiji et al. Aerobic exercise training reduces plasma endothelin-1 concentration in older women. **Journal of applied physiology**, v. 95, n. 1, p. 336-341, 2003.

MAEDA, Seiji et al. Effects of exercise training of 8 weeks and detraining on plasma levels of endothelium-derived factors, endothelin-1 and nitric oxide, in healthy young humans. **Life sciences**, v. 69, n. 9, p. 1005-1016, 2001.

MARCUS, T. et al. Changes in right ventricular ejection fraction rather than pulmonary vascular resistance predicts outcome in patients with pulmonary arterial hypertension. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 181, p. A4809, 2010.

MARKLUND, Stefan L. Superoxide dismutase isoenzymes in tissues and plasma from New Zealand black mice, nude mice and normal BALB/c mice. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 148, n. 1, p. 129-134, 1985.

MARON, Barry J. Structural features of the athlete heart as defined by echocardiography. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 7, n. 1, p. 190-203, 1986.

MATHEW, R. et al. Effects of monocrotaline on endothelial nitric oxide synthase expression and sulfhydryl levels in rat lungs. **Heart disease (Hagerstown, Md.)**, v. 4, n. 3, p. 152-158, 2002.

MATSUMOTO, Hirokazu et al. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 164, n. 1, p. 74-80, 1989.

MATTOCKS, A. R. Toxicology of pyrrolizidine alkaloids in animal. **Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids**, p. 191-219, 1986.

MCALLISTER, RICHARD M. et al. Effects of exercise training on responses of peripheral and visceral arteries in swine. **Journal of Applied Physiology**, v. 80, n. 1, p. 216-225, 1996.

MCCLEAN, Conor et al. Effects of Exercise Intensity on Postexercise Endothelial Function and Oxidative Stress. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2015, n. 723679, p. 1-8, 2015.

MCCORD, Joe M.; FRIDOVICH, Irwin. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **Journal of Biological chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MCGOON, Michael D. et al. Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 25_S, 2013.

MCNABB, LOUIS J.; BALDWIN, KENNETH M. Hemodynamic and metabolic effects of exercise in Crotalaria-induced pulmonary hypertension in rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 57, n. 6, p. 1829-1833, 1984.

MERELES, Derliz et al. Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 114, n. 14, p. 1482-1489, 2006.

MEYRICK, B. O.; REID, L. M. Crotalaria-induced pulmonary hypertension. Uptake of 3H-thymidine by the cells of the pulmonary circulation and alveolar walls. **The American journal of pathology**, v. 106, n. 1, p. 84, 1982.

MEYRICK, BARBARA; GAMBLE, WALTER; REID, LYNNE. Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 239, n. 5, p. H692-H702, 1980.

MITTAL, Manish et al. Hypoxia-dependent regulation of nonphagocytic NADPH oxidase subunit NOX4 in the pulmonary vasculature. **Circulation research**, v. 101, n. 3, p. 258-267, 2007.

MIYAUCHI, Takashi et al. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Circulation research**, v. 73, n. 5, p. 887-897, 1993.

MOCUMBI, Ana Olga; THIENEMANN, Friedrich; SLIWA, Karen. A global perspective on the epidemiology of pulmonary hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 31, n. 4, p. 375-381, 2015.

MONCADA, S. R. M. J.; PALMER, R. M. L.; HIGGS, EA_. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British journal of pharmacology**, v. 147, n. S1, p. S193-S201, 2006.

MONTANI, David et al. Pulmonary arterial hypertension. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 8, n. 1, p. 1, 2013.

MONTANI, David et al. Targeted therapies in pulmonary arterial hypertension. **Pharmacology & therapeutics**, v. 141, n. 2, p. 172-191, 2014.

MOREIRA-GONÇALVES, Daniel et al. Cardioprotective effects of early and late aerobic exercise training in experimental pulmonary arterial hypertension. **Basic research in cardiology**, v. 110, n. 6, p. 1-15, 2015.

MURPHY, Michael P. et al. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. **Cell metabolism**, v. 13, n. 4, p. 361-366, 2011.

NAGENDRAN, Jayan et al. Endothelin axis is upregulated in human and rat right ventricular hypertrophy. **Circulation research**, v. 112, n. 2, p. 347-354, 2013.

NEWBY, Andrew C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. **Cardiovascular research**, v. 69, n. 3, p. 614-624, 2006.

OGAWA, Yoshihiro et al. Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 178, n. 1, p. 248-255, 1991.

OHKITA, Mamoru et al. Pathophysiological roles of endothelin receptors in cardiovascular diseases. **Journal of pharmacological sciences**, v. 119, n. 4, p. 302-313, 2012.

OMS/FIMS Posicionamento oficial. **Rev. Bras. Med. Esp.** Vol 4, N°4: 120-121, jul/ago, 1998.

OTA, Jaquelina S.; DE CASTRO PEREIRA, Carlos Alberto. Cor pulmonale. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 31, n. 2, p. 241-246, 1998.

OZAKI, Masanori et al. Reduced hypoxic pulmonary vascular remodeling by nitric oxide from the endothelium. **Hypertension**, v. 37, n. 2, p. 322-327, 2001.

OZTURK, Elif Inci; UMA, Serdar. Effects of atorvastatin and L-arginine treatments on electrical field stimulation-mediated relaxations in pulmonary arterial rings of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 498-505, 2010.

PACAGNELLI, Francis Lopes et al. Preventive aerobic training exerts a cardioprotective effect on rats treated with monocrotaline. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 97, n. 3, p. 238-247, 2016.

PARK, Jonghoon; OMI, Naomi. The effects of different exercise modes for preventing endothelial dysfunction of arteries and bone loss in ovariectomized rats. **Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry**, v. 18, n. 2, p. 133, 2014.

PARRIS, Richard J.; WEBB, David J. The endothelin system in cardiovascular physiology and pathophysiology. **Vascular medicine (London, England)**, v. 2, n. 1, p. 31-43, 1996.

PARVIZ, Maryam et al. Effects of chronic pulmonary overcirculation on pulmonary vasomotor tone. **The Annals of thoracic surgery**, v. 67, n. 2, p. 522-527, 1999.

PENG, Xinqi et al. Inducible nitric oxide synthase contributes to ventilator-induced lung injury. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 172, n. 4, p. 470-479, 2005.

PEREIRA, BCRLF et al. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in muscle and lymphoid organs of sedentary and exercise-trained rats. **Physiology & behavior**, v. 56, n. 5, p. 1095-1099, 1994.

PICK, Edgar; KEISARI, Yona. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of immunological methods**, v. 38, n. 1, p. 161-170, 1980.

POLJSAK, B. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2011, 2011.

PORTAL DO CORAÇÃO: Cardiologia, saúde e bem-estar. Cor pulmonale. Jul de 2008.

PORTER, M. M. et al. Capillary supply of the tibialis anterior muscle in young, healthy, and moderately active men and women. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 4, p. 1451-1457, 2002.

PRIOR, Barry M. et al. Exercise-induced vascular remodeling. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 31, n. 1, p. 26-33, 2003.

QUINDRY, John C. et al. Mitochondrial KATP channel inhibition blunts arrhythmia protection in ischemic exercised hearts. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 299, n. 1, p. H175-H183, 2010.

RABINOVITCH, Marlene. Pulmonary hypertension: updating a mysterious disease. **Cardiovascular research**, v. 34, n. 2, p. 268-272, 1997.

RADAK, ZSOLT et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 1, p. 69-74, 1999.

RAPOPORT, Robert M.; MURAD, Ferid. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. **Circulation Research**, v. 52, n. 3, p. 352-357, 1983.

REDMOND, Eileen M. et al. Regulation of endothelin receptors by nitric oxide in cultured rat vascular smooth muscle cells. **Journal of cellular physiology**, v. 166, n. 3, p. 469-479, 1996.

REDOUT, Everaldo M. et al. Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. **Cardiovascular research**, v. 75, n. 4, p. 770-781, 2007.

REID, M. J. et al. Involvement of cytochrome P450 3A in the metabolism and covalent binding of ¹⁴C-monocrotaline in rat liver microsomes. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 12, n. 3, p. 157-166, 1998.

REINDEL, J. F. et al. Development of morphologic, hemodynamic, and biochemical changes in lungs of rats given monocrotaline pyrrole. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 106, n. 2, p. 179-200, 1990.

REZNICK, Abraham Z.; PACKER, Lester. [38] Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in enzymology**, v. 233, p. 357-363, 1994.

RIBEIRO, AC Mendes et al. Abnormalities in L-arginine transport and nitric oxide biosynthesis in chronic renal and heart failure. **Cardiovascular research**, v. 49, n. 4, p. 697-712, 2001.

ROCIC, Petra et al. Optimal reactive oxygen species concentration and p38 MAP kinase are required for coronary collateral growth. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 6, p. H2729-H2736, 2007.

RODMAN, D. M.; VOELKEL, N. F. Regulation of vascular tone. **The lung. Scientific Foundations. Philadelphia: Lippincott-Raven**, p. 1473-92, 1997.

RODRIGUES, Bruno et al. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. **Cardiovascular diabetology**, v. 6, n. 1, p. 1, 2007.

ROSENBERG, HERSCHEL C.; RABINOVITCH, MARLENE. Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 255, n. 6, p. H1484-H1491, 1988.

RUBANYI, G. M.; POLOKOFF, MA 1. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. **Pharmacological reviews**, v. 46, n. 3, p. 325-415, 1994.

RUBENS, Christoph et al. Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. **CHEST Journal**, v. 120, n. 5, p. 1562-1569, 2001.

RUBIN, Lewis J. Cellular and molecular mechanisms responsible for the pathogenesis of primary pulmonary hypertension. **Pediatric pulmonology**, v. 27, n. S18, p. 194-197, 1999.

RUBIN, Lewis J. Introduction: diagnosis and management of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. **CHEST Journal**, v. 126, n. 1_suppl, p. 7S-10S, 2004.

RUDSKI, Lawrence G. et al. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography: endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the Canadian Society of Echocardiography. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 23, n. 7, p. 685-713, 2010.

RUECKSCHLOSS, Uwe et al. Induction of NAD (P) H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy. **Circulation**, v. 104, n. 15, p. 1767-1772, 2001.

RUNO, James R.; LOYD, James E. Primary pulmonary hypertension. **The Lancet**, v. 361, n. 9368, p. 1533-1544, 2003.

SAHNI, Sonu et al. Pulmonary rehabilitation and exercise in pulmonary arterial hypertension: An underutilized intervention. **Journal of exercise rehabilitation**, v. 11, n. 2, p. 74-79, 2015.

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

SCALBERT, Augustin; WILLIAMSON, Gary. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 8, p. 2073S-2085S, 2000.

SCHENKEL, Paulo C. et al. Catalase influence in the regulation of coronary resistance by estrogen: joint action of nitric oxide and hydrogen peroxide. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, 2014.

SCHERMULY, Ralph T. et al. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. **Nature Reviews Cardiology**, v. 8, n. 8, p. 443-455, 2011.

SCHULZ, Eberhard et al. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. **Antioxidants & redox signaling**, v. 10, n. 6, p. 1115-1126, 2008.

SEMIN, I. L. G. I. et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels of intestinal renal and muscle tissues after a 60 minutes exercise in trained mice. **Indian journal of physiology and pharmacology**, v. 44, n. 4, p. 419-427, 2000.

SETA, Francesca et al. Pulmonary oxidative stress is increased in cyclooxygenase-2 knockdown mice with mild pulmonary hypertension induced by monocrotaline. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23439, 2011.

SIES, Helmut. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **The American journal of medicine**, v. 91, n. 3, p. S31-S38, 1991.

SILVA, Fabiano Leichsenring. Adaptação oxidativa e funcional progressiva do sistema cardiopulmonar secundária à hipertensão arterial pulmonar em ratos. 2011.

SIMONNEAU, Gerald et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 25, p. D34-D41, 2013.

SINGAL, Pawan K.; FARAHMAND, Firoozeh; HILL, Michael F. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 260, n. 1, p. 21-29, 2004.

SIQUEIRA, Rafaela. Efeitos da ovariectomia no estresse oxidativo em pulmão e ventrículo direito de ratas com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina. 2015.

SOUZA-RABBO, Maristela P. et al. EFFECTS OF A CHRONIC EXERCISE TRAINING PROTOCOL ON OXIDATIVE STRESS AND RIGHT VENTRICULAR

HYPERTROPHY IN MONOCROTALINE-TREATED RATS. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, n. 8, p. 944-948, 2008.

STENMARK, Kurt R. et al. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 297, n. 6, p. L1013-L1032, 2009.

STEWART, Duncan J. et al. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease?. **Annals of internal medicine**, v. 114, n. 6, p. 464-469, 1991.

STORME, Laurent et al. Acute intrauterine pulmonary hypertension impairs endothelium-dependent vasodilation in the ovine fetus. **Pediatric research**, v. 45, p. 575-581, 1999.

STOW, Lisa R. et al. Endothelin-1 gene regulation. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 1, p. 16-28, 2011.

SUN, D. O. N. G. et al. Short-term daily exercise activity enhances endothelial NO synthesis in skeletal muscle arterioles of rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 76, n. 5, p. 2241-2247, 1994.

SUZUKI, Nobuhiro et al. A sensitive sandwich-enzyme immunoassay for human endothelin. **Journal of immunological methods**, v. 118, n. 2, p. 245-250, 1989.

TABIMA, Diana M.; FRIZZELL, Sheila; GLADWIN, Mark T. Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 9, p. 1970-1986, 2012.

TADDEI, Stefano et al. Physical activity prevents age-related impairment in nitric oxide availability in elderly athletes. **Circulation**, v. 101, n. 25, p. 2896-2901, 2000.

TANABE, T. et al. Exercise training improves ageing-induced decrease in eNOS expression of the aorta. **Acta physiologica Scandinavica**, v. 178, n. 1, p. 3-10, 2003.

TAYLOR, Ryan P.; CICCOLO, Joseph T.; STARNES, Joseph W. Effect of exercise training on the ability of the rat heart to tolerate hydrogen peroxide. **Cardiovascular research**, v. 58, n. 3, p. 575-581, 2003.

THOMAS, H. C. et al. Cell cycle alterations associated with covalent binding of monocrotaline pyrrole to pulmonary artery endothelial cell DNA. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 141, n. 1, p. 319-329, 1996.

THOMAS, Shane R.; CHEN, Kai; KEANEY, John F. Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 8, p. 6017-6024, 2002.

THORIN, Eric; WEBB, David J. Endothelium-derived endothelin-1. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 459, n. 6, p. 951-958, 2010.

TOKARNIA, C.H. et al. **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. 320p.

TRACHOOTHAM, Dunyaporn et al. Redox regulation of cell survival. **Antioxidants & redox signaling**, v. 10, n. 8, p. 1343-1374, 2008.

TRAVACIO, Marina; POLO, José María; LLESUY, Susana. Chromium (VI) induces oxidative stress in the mouse brain. **Toxicology**, v. 150, n. 1, p. 137-146, 2000.

TSUTSUI, Hiroyuki; KINUGAWA, Shintaro; MATSUSHIMA, Shouji. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. **Cardiovascular research**, v. 81, n. 3, p. 449-456, 2009.

TSUTSUI, Hiroyuki; KINUGAWA, Shintaro; MATSUSHIMA, Shouji. Oxidative stress and heart failure. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 301, n. 6, p. H2181-H2190, 2011.

TUDER, Rubin M. et al. Development and pathology of pulmonary hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, n. 1s1, p. S3-S9, 2009.

TUDER, Rubin M. et al. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 159, n. 6, p. 1925-1932, 1999.

TURNER, J. H. et al. Experimental cor pulmonale in the rat. **Arch. Pathol.**, v. 79, p. 409-418, 1965.

URBONIENE, Dalia et al. Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 299, n. 3, p. L401-L412, 2010.

VAILLANCOURT, Mylène et al. Adaptation and remodelling of the pulmonary circulation in pulmonary hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 31, n. 4, p. 407-415, 2015.

VALDEZ, Laura B.; ZAOBORNYY, Tamara; BOVERIS, Alberto. Functional activity of mitochondrial nitric oxide synthase. **Methods in enzymology**, v. 396, p. 444-455, 2005.

VAN GUILDER, Gary P. et al. Endothelin-1 vasoconstrictor tone increases with age in healthy men but can be reduced by regular aerobic exercise. **Hypertension**, v. 50, n. 2, p. 403-409, 2007.

VASCONCELOS, Sandra Mary Lima et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química nova. São Paulo. Vol. 30, n. 5 (Sept./Oct. 2007), p. 1323-1338**, 2007.

VENDITTI, C. P. et al. Congenital cardiomyopathy and pulmonary hypertension: another fatal variant of cytochrome-c oxidase deficiency. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 27, n. 6, p. 735-739, 2004.

VENDITTI, P.; MASULLO, P.; DI MEO, S. Effect of training on H₂O₂ release by mitochondria from rat skeletal muscle. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 372, n. 2, p. 315-320, 1999.

VENTETUOLO, Corey E.; KLINGER, James R. WHO Group 1 pulmonary arterial hypertension: current and investigative therapies. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 55, n. 2, p. 89-103, 2012.

VOELKEL, Norbert F. et al. Right ventricular function and failure report of a national heart, lung, and blood institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. **Circulation**, v. 114, n. 17, p. 1883-1891, 2006.

WEBB RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ.* 2003; 27: 201-6.

WEDGWOOD, Stephen; BLACK, Stephen M. Endothelin-1 decreases endothelial NOS expression and activity through ETA receptor-mediated generation of hydrogen peroxide. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 288, n. 3, p. L480-L487, 2005.

WEDGWOOD, Stephen; DETTMAN, Robert W.; BLACK, Stephen M. ET-1 stimulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 281, n. 5, p. L1058-L1067, 2001.

WEI, Yongzhong et al. Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 46, p. 35137-35146, 2006.

WERCHAN, Paul M. et al. Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 256, n. 5, p. H1328-H1336, 1989.

WEINSTEIN, Ali A. et al. Effect of aerobic exercise training on fatigue and physical activity in patients with pulmonary arterial hypertension. **Respiratory medicine**, v. 107, n. 5, p. 778-784, 2013.

WILLIAMS, M. Coburn; MOLYNEUX, Russell J. Occurrence, concentration, and toxicity of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* seeds. **Weed Science**, p. 476-481, 1987.

WILSON, Dennis W. et al. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. **Critical reviews in toxicology**, v. 22, n. 5-6, p. 307-325, 1992.

WIRTH, Angela et al. G12-G13–LARG–mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. **Nature medicine**, v. 14, n. 1, p. 64-68, 2008.

XU, Dong et al. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. **Cell**, v. 78, n. 3, p. 473-485, 1994.

XU, Weiling et al. Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. **The FASEB journal**, v. 18, n. 14, p. 1746-1748, 2004.

XUE, Chun; JOHNS, Roger A. Endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. **N Engl J Med**, v. 333, n. 24, p. 1642-4, 1995.

YANAGISAWA, Masashi et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **nature**, v. 332, n. 6163, p. 411-415, 1988.

YILDIZ, Pinar. Molecular mechanisms of pulmonary hypertension. **Clinica Chimica Acta**, v. 403, n. 1, p. 9-16, 2009.

YOKOYAMA, Mitsuhiro; HIRATA, Ken-ichi. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling: Is it a physiological mechanism of endothelium-dependent relaxation in cerebral artery?. **Cardiovascular research**, v. 73, n. 1, p. 8-9, 2007.

YU, Byung Pal. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological reviews**, v. 74, n. 1, p. 139-162, 1994.

YU, Jun et al. Altered expression and signal transduction of endothelin-1 receptors in heritable and idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Journal of cellular physiology**, v. 228, n. 2, p. 322-329, 2013.

YUSUF, Salim et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. **The Lancet**, v. 364, n. 9438, p. 937-952, 2004.

ZAFRIR, Barak. Exercise training and rehabilitation in pulmonary arterial hypertension: rationale and current data evaluation. **Journal of cardiopulmonary rehabilitation and prevention**, v. 33, n. 5, p. 263-273, 2013.

ZAGO, Anderson Saranz; ZANESCO, Angelina. Óxido nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, p. e264-e270, 2006.

ZAMBELLI, Vanessa et al. Efficacy of aminaftone in a rat model of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **European journal of pharmacology**, v. 667, n. 1, p. 287-291, 2011.