

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA

Silvio Tasca

**PTEROSTILBENO REDUZ O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR  
INFARTO DO MIOCÁRDIO EXPERIMENTAL NOS SISTEMAS  
CARDIOVASCULAR E HEPATO-PULMONAR**

Porto Alegre

2020

Silvio Tasca

**PTEROSTILBENO REDUZ O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR  
INFARTO DO MIOCÁRDIO EXPERIMENTAL NOS SISTEMAS  
CARDIOVASCULAR E HEPATO-PULMONAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo  
Coorientadora: Dra. Cristina Campos Carraro

Porto Alegre

2020

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Selvino (*in memoriam*) e Terezinha, agradeço os incentivos dados aos estudos desde criança. Aos meus irmãos, Flori e Solange que mesmo de longe, torceram para que tudo desse certo.

Agradeço a minha família, Rosane e Gabriel, pela paciência e pelo amor incondicional. Sabíamos que não seria fácil, mas enfrentamos as dificuldades juntos.

Ao meu orientador professor Alex, pela forma que me acolheu quando cheguei à UFRGS nessa nova jornada. A maneira que conduziu a pesquisa e a sua dedicação e talento em orientar, tornou esse trabalho mais leve de se fazer.

A minha co-orientadora, incansável Cristina, pelo esforço e companheirismo, sempre presente nos experimentos, auxiliou-me em cada etapa desse trabalho.

Aos professores do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular – professora Adriane, professor Alexandre e professor Paulo, obrigado pelo convívio e pelos conhecimentos repassados.

Aos pesquisadores e colegas Eduardo, Patrick, Vanessa, Giane, Alexsandra, Denise, Bruna, Jéssica, Rosalia, Isadora. Obrigado pela troca de experiências e apoio dado nesse período.

Agradeço a Tânia pelo carinho e disponibilidade a todo o momento no laboratório. Aos meus colegas de curso, Silvia e Leonardo, obrigado pelo apoio e por enfrentarmos as dificuldades juntos.

Aos meus amigos e incentivadores para continuar estudando: em especial a Clarisse, Greice e Guilherme. Obrigado meus amigos pela amizade e carinho que tem por mim.

Ao Dr. Sérgio do Laboratório Fleming de Novo Hamburgo, pela gentileza de deixar utilizar seu laboratório para dosarmos alguns testes enzimáticos.

“A persistência é o caminho do êxito”.

Charles Chaplin

## RESUMO

O infarto agudo do miocárdio pode induzir alterações hemodinâmicas nos pulmões, fígado e vasos e provocar estresse oxidativo principalmente nos pulmões e ventrículo direito. Pterostilbeno, composto fenólico da classe dos estilbenoides, apresenta propriedades antioxidantes, o que poderia melhorar esse cenário. Este estudo avaliou o impacto do infarto do miocárdio na homeostase redox nos pulmões, ventrículo direito (VD), aorta e fígado. Além disso, visava propor o pterostilbeno como uma abordagem terapêutica adjunta. Para isso, ratos Wistar machos foram alocados em três grupos: controle (SHAM), infartados (MI), infartados tratados com pterostilbeno (MI+PS). Sete dias após a indução do infarto do miocárdio, os grupos MI e MI+PS iniciaram o tratamento com 100mg/kg/dia de pterostilbeno complexado com ciclodextrina por gavagem e teve duração de oito dias. Em seguida, foram realizados exames ecocardiográficos, dados foram coletados, os animais foram eutanasiados, órgãos removidos para posteriores análises morfométricas e bioquímicas. Foram realizadas as análises de concentrações das espécies reativas totais de oxigênio (ROS), peroxidação lipídica (TBARS), atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GST), NADPH oxidase, óxido nítrico sintase (NOS), antioxidantes não enzimáticos – sistema glutathione: grupos sulfidrilas totais; glutathione reduzida (GSH); glutathione oxidada (GSSG); glutathione totais. Imunoconteúdo da proteína Nfr2 e xantina oxidase. Resultados: o grupo MI apresentou congestão pulmonar e o tratamento melhorou este parâmetro no grupo MI+PS. Este mesmo grupo, (MI+PS) demonstrou um discreto aumento no volume sistólico final em relação ao MI através da análise ecocardiográfica, corroborando para prevenir a congestão pulmonar. O tratamento com pterostilbeno aumentou as atividades de algumas enzimas antioxidantes no tecido pulmonar (SOD e CAT), assim como preveniu a peroxidação lipídica, evitando dano no tecido pulmonar. Houve um aumento da expressão da proteína Nfr2 no grupo MI+PS, reforçando a hipótese do efeito hormético desempenhado pelo estilbenoide – pterostilbeno. No VD, verificamos níveis diminuídos de grupos sulfidrilas totais e da atividade da enzima óxido

nítrico sintase no grupo MI, bem como a produção aumentada do ânion superóxido neste grupo. Esses parâmetros foram atenuados pelo tratamento com pterostilbeno. Na aorta, tivemos um aumento da atividade da NADPH oxidase e xantina oxidase no grupo MI. Com o tratamento o grupo MI+PS conseguiu mitigar essas alterações oxidativas, assim como elevar os níveis de sulfidrilas totais um importante sistema antioxidante não enzimático. No fígado, não tivemos alterações significativas e por não podemos dosar as enzimas hepáticas no soro, não conseguimos avaliar dano hepático. Portanto, o infarto do miocárdio pode causar uma diminuição nas proteções antioxidantes principalmente nos pulmões e ventrículo direito. No entanto, o pterostilbeno parece proteger contra os danos do estresse oxidativo no tecido pulmonar, ativando a via Nrf2 e no ventrículo direito, justificando a redução da produção do ânion superóxido e melhora parcial na biodisponibilidade de NO neste local.

## ABSTRACT

Acute myocardial infarction can induce hemodynamic changes in the lungs, liver, and vessels and provoke oxidative stress, especially in the lungs and right ventricle. Pterostilbene, a phenolic compound of the stilbenoid class, has antioxidant properties, which could improve this scenario. This study evaluated the impact of myocardial infarction on the redox homeostasis in the lungs, right ventricle, aorta, and liver. Furthermore, aimed to propose pterostilbene as an adjunct therapeutic approach. Male Wistar rats were allocated into three groups: SHAM, MI (infarcted), and MI+PS (MI+pterostilbene). Seven days after MI induction, treatment with pterostilbene (100 mg/kg/day-gavage) was started for 8 days. Then, echocardiographic examinations were performed, data were collected, animals were sacrificed, organs were removed for further morphometric and biochemical analysis. Analyzes of concentrations of total reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation (TBARS), activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) were performed, NADPH oxidase, nitric oxide synthase (NOS), non-enzymatic antioxidants - glutathione system: total sulfhydryl groups; reduced glutathione (GSH); oxidized glutathione (GSSG); total glutathione. Immunocontent of Nfr2 protein and xanthine oxidase. Results: MI group presented pulmonary congestion and treatment improved this pulmonary parameter in MI+PS group. This same group (MI+PS) demonstrated a smaller increase in final systolic volume compared to MI through echocardiographic analysis corroborating to prevent pulmonary congestion. Treatment with pterostilbene increased the activities of some antioxidant enzymes in lung tissue (SOD and CAT), but prevented lipid peroxidation by preventing lung tissue damage. There was an increase in Nfr2 protein expression in the MI+PS group, demonstrating the hypothesis of the hormonal effect of stylbenoid - pterostilbene. In RV, we observed decreased levels of total sulfhydryl groups and nitric oxide synthase enzyme activity in Group MI, as well as greatly increased superoxide anion production in this group. These parameters were attenuated by pterostilbene. In the aorta we had an increased activity of NADPH oxidase and xanthine oxidase in the MI group. With the

treatment the MI+PS group was able to mitigate these oxidative stress parameters as well as increase the total sulfhydryl levels, an important non-enzymatic antioxidant system. In the liver, we did not have significant changes and, because we cannot measure liver enzymes in the serum, we were unable to assess liver damage. Therefore, myocardial infarction may cause a decrease in antioxidant protections especially in the lungs and right ventricle. However, pterostilbene appears to protect against oxidative stress damage in lung tissue by activating the Nrf2 pathway and right ventricle by reducing superoxide anion production and partially improving NO bioavailability at this site.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ALT – alanina aminotransferase

ATP – adenosina trifosfato

ATPase – enzima adenosinatrifosfatase

AST – aspartato aminotransferase

CAT – enzima catalase

CDNB– 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

Cu<sup>+</sup> – cobre na forma iônica (íon cuproso)

Cys32 e Cys35 – resíduos de cisteínas

DCFH-DA – diacetato de diclorofluoresceína

DTNB – 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico)

ERNs – espécies reativas de nitrogênio

EROs – espécies reativas de oxigênio

Fe<sup>2+</sup> – ferro na forma iônica (íon ferroso)

G6PD – glicose 6-fosfato desidrogenase

GSH – glutationa reduzida

GSSG – glutationa oxidada

GST – glutationa-S-transferase

GPx – glutationa peroxidase

GR – glutationa redutase

H<sub>2</sub>O - água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

IAM – infarto agudo do miocárdio

LDH – lactato desidrogenase

MI – grupo infartado

MI+PS – grupo infartado tratado com pterostilbeno

Keap1 – do inglês – Kelch-like ECH-associated Proteín 1

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NADP<sup>+</sup> – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

NOO<sup>-</sup> – oxinitrito

Nrf2 – Fator nuclear eritróide relacionado ao fator 2

O<sub>2</sub><sup>-•</sup> – radical ânion superóxido

OH<sup>•</sup> – radical hidroxila

OH<sup>-</sup> – ânion hidroxila

OONO<sup>-</sup> – peroxinitrito

pH – potencial hidrogeniônico

sMaf – do inglês – small musculoaponeurotic fibrosarcoma

SHAM – grupo controle

SOD – enzima superóxido dismutase

Se-OH – ácido selenênico

Se-H – selenol

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Trx – tioredoxina

TrxR – tioredoxina redutase

VD – ventrículo direito

VE – ventrículo esquerdo

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Formação de espécies reativas de oxigênio.

**Figura 2.** Geração do radical hidroxila mediada pela interação metais- $H_2O_2$ .

**Figura 3.** Principais fontes de geração de espécies reativas de oxigênio e consequentes danos dos radicais livres.

**Figura 4.** Redução do peróxido de hidrogênio pela Gpx-1.

**Figura 5.** Caminhos redox envolvidos na manutenção dos cofatores necessários para ativação da Gpx-1.

**Figura 6.** Sistema tireodoxina.

**Figura 7.** Reações das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona redutase (GPx).

**Figura 8.** Estrutura química do resveratrol e pterostilbeno.

**Figura 9.** Modelo esquemático da via Nfr2/Keap1.

**Figura 10.** Esquema representativo do desenho experimental.

**Figura 11.** Cirurgia de ligadura da artéria descendente anterior.

**Figura 12.** Estresse oxidativo pulmonar.

**Figura 13.** Medidas antioxidantes no pulmão.

**Figura 14.** Imunoconteúdo da proteína Nfr2 no tecido pulmonar.

**Figura 15.** Concentração de espécies reativas de oxigênio totais no ventrículo direito.

**Figura 16.** Grupo sulfidrila no ventrículo direito.

**Figura 17.** Atividade da NADPH oxidase no ventrículo direito.

**Figura 18.** Atividade da enzima óxido nítrico sintase no ventrículo direito.

**Figura 19.** Imunoconteúdo da xantina oxidase no ventrículo direito.

**Figura 20.** Concentração de espécies reativas de oxigênio totais na artéria aorta.

**Figura 21.** Atividade da NADPH oxidase na artéria aorta.

**Figura 22.** Atividade da enzima óxido nítrico sintase na artéria aorta.

**Figura 23.** Grupo sulfidrilas na artéria aorta.

**Figura 24.** Imunoconteúdo da proteína xantina oxidase na artéria aorta.

**Figura 25.** Concentração de espécies reativas de oxigênio totais no fígado.

**Figura 26.** Grupo sulfidrilas no fígado.

**Figura 27.** Atividade da glutationa-S-transferase (GST) no fígado.

**Figura 28.** Peroxidação lipídica no fígado.

**Figura 29.** Representação gráfica das conclusões.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Avaliação ecocardiográfica do ventrículo esquerdo.

**Tabela 2.** Resultados morfométricos dos pulmões e ventrículos direito e esquerdo.

**Tabela 3.** Parâmetros redox nos pulmões.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>16</b>
1.1. Doenças cardiovasculares.....	16
1.1.1. Epidemiologia.....	16
1.1.2. Infarto do miocárdio e aterosclerose.....	16
1.1.3 Remodelamento pós-infarto do miocárdio.....	17
1.1.4 Modelos experimentais de lesão cardíaca (infarto) .....	20
1.2. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	21
1.3. Antioxidantes.....	24
<b>2. Estilbenoides.....</b>	<b>28</b>
<b>3. Fator nuclear eritróide relacionado ao fator 2 (Nrf2).....</b>	<b>30</b>
<b>4. Hormese.....</b>	<b>32</b>
<b>5. Hipótese.....</b>	<b>33</b>
<b>6. Objetivos.....</b>	<b>33</b>
6.1. Objetivos específicos.....	34
<b>7. Análise estatística.....</b>	<b>34</b>
<b>8. Materiais e métodos.....</b>	<b>35</b>
8.1. Produtos químicos.....	35
8.2. Aspectos éticos.....	35
8.3. Origem dos animais.....	35
8.4. Desenho experimental e grupos experimentais.....	36
8.5. Modelo de IAM pela oclusão da coronária descendente anterior.....	37
8.6. Tratamento com pterostilbeno.....	38
8.7. Avaliação ecocardiográfica.....	38
8.8. Tecidos retirados e analisados.....	39
8.9. Análises morfométricas do ventrículo direito, esquerdo e pulmões.....	40

8.10. Preparação do homogeneizados do pulmão e ventrículo direito.....	41
8.11. Preparação do homogeneizado da aorta e do fígado.....	41
8.12. Avaliação do estresse oxidativo.....	41
8.13. Atividade da NADPH oxidase.....	42
8.14. Determinação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.....	42
8.15. Atividade da enzima óxido nítrico sintase.....	43
8.16. Análise da expressão proteica da Nfr2 e xantina oxidase.....	43
8.17. Descarte de materiais biológicos e químicos.....	44
<b>9. Resultados.....</b>	<b>44</b>
9.1. Avaliação ecocardiográfica do ventrículo esquerdo.....	44
9.2. Análises morfométricas do pulmão, ventrículo direito e esquerdo.....	45
9.3. Papel do estresse oxidativo no tecido pulmonar de animais infartados e o impacto do tratamento com pterostilbeno.....	46
9.4. Papel do estresse oxidativo no ventrículo direito de animais infartados e o impacto do tratamento com pterostilbeno.....	50
9.5. Alterações das concentrações das espécies reativas e sua produção pela NADPH oxidase na Aorta.....	53
9.6. Fígado: implicações sobre parâmetros do estresse oxidativo e impacto do tratamento com pterostilbeno.....	57
<b>10. Discussão.....</b>	<b>60</b>
<b>11. Conclusões.....</b>	<b>67</b>
<b>12. Perspectivas.....</b>	<b>69</b>
<b>13. Referências bibliográficas.....</b>	<b>71</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Doenças Cardiovasculares

#### 1.1.1 Epidemiologia

Segundo levantamento da Organização Mundial da Saúde estima-se que 17,9 milhões de pessoas morreram no ano de 2016 por doenças cardiovasculares e esse número corresponde aproximadamente a 31% de todas as causas de morte no mundo<sup>1</sup>. Dentre as doenças cardiovasculares, destacam-se as doenças isquêmicas do coração e acidentes vasculares cerebrais que representam um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo<sup>2</sup>. A taxa de mortalidade no Brasil, para este grupo de causas, é de 183,3 óbitos/100.000 habitantes e encontra-se entre as maiores taxas de mortalidade do mundo<sup>2</sup>.

#### 1.1.2 Infarto do miocárdio e aterosclerose

O infarto do miocárdio geralmente um evento agudo, ocorre quando o fluxo sanguíneo coronariano é interrompido por placas ou trombos ateroscleróticos rotos. A aterosclerose é uma doença multifatorial, crônica, progressiva e sistêmica, que envolve o endotélio dos vasos, o qual é responsável pela homeostase vascular. A partir de uma agressão inicial ao endotélio, uma resposta inflamatória e proliferativa é iniciada, alterando a função de homeostase e promovendo, com isso, uma resposta inflamatória local<sup>5</sup>.

Os processos metabólicos e inflamatórios crônicos são caracterizados pela formação de placas constituídas por um núcleo rico em colesterol (ateroma) cercado por uma capa fibrosa (esclerose). Placas ateroscleróticas instáveis coronarianas podem sofrer rupturas e desencadear o infarto agudo do miocárdio<sup>5</sup>. Neste contexto, pode ocorrer uma diminuição do suprimento de oxigênio e nutrientes ao miocárdio, resultando em isquemia e hipóxia tecidual.

Durante uma isquemia prolongada, os níveis de ATP e o pH intracelular diminuem como resultado do metabolismo anaeróbico e do acúmulo de lactato. Como consequência, os mecanismos de transportes de íons dependente da ATPase se tornam disfuncionais, contribuindo para elevação das concentrações intracelular e mitocondrial de cálcio<sup>13</sup>. Embora os níveis de oxigênio sejam restaurados caso haja reperfusão, ocorre um aumento da geração de espécies reativas de oxigênio. Tanto em humanos como em modelos animais, danos irreversíveis aos cardiomiócitos ocorrem após 20 minutos de isquemia<sup>13</sup>. Essa interrupção do fluxo sanguíneo coronariano gera alterações hemodinâmicas, neuro-humorais e metabólicas responsáveis pelos efeitos negativos em outros órgãos como pulmões e fígado<sup>3,4</sup>.

Após o infarto agudo do miocárdio (IAM), ocorrem alterações anatômicas no tecido cardíaco, incluindo cicatrização (fibrose de substituição), hipertrofia e dilatação, podendo levar a uma disfunção ventricular esquerda como, por exemplo, regurgitação mitral. Em resposta a isso, ocorre elevação das pressões arteriais e venosas do pulmão, provocando hipertensão pulmonar e consequente aumento da pós-carga para o ventrículo direito<sup>3</sup>. Hill e colaboradores demonstraram que a resposta antioxidante do ventrículo direito foi reduzida por 16 semanas após infarto do miocárdio<sup>19</sup>. Consequentemente com essa má adaptação, há grande probabilidade de desenvolvimento de insuficiência cardíaca.

### 1.1.3 Remodelamento pós-infarto do miocárdio

A remodelação do ventrículo esquerdo após infarto do miocárdio é um processo dinâmico e complexo que ocorre ao dano do miocárdio. Inicialmente a dilatação do ventrículo esquerdo é considerada um mecanismo protetor para manter a função sistólica cardíaca<sup>29</sup>. A redução da massa cardíaca contrátil após o IAM é irreversível e a hiperplasia induzida por mitose raramente ocorre em células cardíacas diferenciadas. Essa perda de células cardíacas deve ser compensada pela deposição de tecido cicatricial para manter a integridade da câmara dos ventrículos. Para evitar a falha cardíaca e o colapso

hemodinâmico, respostas adaptativas neuro-humorais (sistema nervoso simpático e sistema renina-angiotensina-aldosterona) podem ser constantemente ativadas para manter a perfusão sanguínea adequada dos tecidos<sup>30</sup>. No entanto, a ativação crônica desses mecanismos geralmente não é adaptativa e converge progressivamente para o fracasso global do sistema cardiovascular e o desenvolvimento da insuficiência cardíaca. Destacamos as principais consequências sistêmicas da ativação neuro-humoral crônica: aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; estresse da parede do ventrículo esquerdo; comprometimento do preenchimento do ventrículo esquerdo durante a diástole devido à prolongada vasoconstrição<sup>30</sup>. A elevação do estresse do ventrículo esquerdo, a pressão de enchimento e a sobrecarga do volume circulatório induzem um padrão de hipertrofia cardíaca dilatada marcada pelo afinamento da parede do ventrículo esquerdo devido à deposição de sarcômeros dispostos em série e aumento do ventrículo esquerdo<sup>30</sup>. Isso tem reflexo tanto no ventrículo direito quanto na circulação pulmonar. Vale ressaltar que o sistema cardiovascular está intimamente ligado ao sistema respiratório.

Disfunções sistólicas e diastólicas do ventrículo esquerdo, bem como a estenose da artéria aorta e/ou mitral e/ou regurgitação, podem aumentar a pressão do ventrículo esquerdo e subsequentemente a pressão atrial esquerda durante um período de tempo. Essa elevação da pressão atrial esquerda é característica fisiopatológica da hipertensão pulmonar por doença cardíaca esquerda, considerada o tipo mais comum de hipertensão pulmonar<sup>31</sup>. Pressão atrial esquerda elevada pode então ser transmitida para a vasculatura pulmonar, através das veias pulmonares, levando ao espessamento da camada íntima e hipertrofia da camada média dessa vasculatura; desta forma estabelecendo a hipertensão pulmonar<sup>31</sup>.

O primeiro mecanismo compensatório do ventrículo direito para a pressão pulmonar elevada é a hipertrofia. Assim, o ventrículo direito pode se adaptar com um aumento de 4 a 5 vezes à contratilidade do miocárdio, um processo que é descrito fisiopatologicamente como “acoplamento ventrículo direito-artéria pulmonar”. Porém, progressivamente o ventrículo direito começa a dilatar, o estresse na parede aumenta e ocorre um desequilíbrio entre demanda

e suprimento de oxigênio. Ocorre isquemia do ventrículo direito, diminui a contratilidade e o ventrículo direito, dessa forma, falha em manter o débito cardíaco e inevitavelmente o “descoplamento” e as descompensações<sup>31</sup>. Ainda neste contexto, o desenvolvimento de insuficiência valvar tricúspide e pulmonar, induzida pelo infarto, leva à sobrecarga do volume do ventrículo direito e diminui ainda mais o volume sistólico comprometendo tanto a hemodinâmica sistêmica como a circulação pulmonar<sup>31</sup>.

A alteração hemodinâmica mais frequente pós-infarto do miocárdio é o choque cardiogênico, síndrome clínica caracterizada por hipotensão sistêmica, hipotensão secundária e débito cardíaco insuficiente<sup>59</sup>. A situação predominante de débito cardíaco baixo geralmente acompanha um distúrbio de trocas gasosas pulmonares, que leva a hipoxemia sistêmica e pode reduzir o suprimento de oxigênio aos hepatócitos<sup>60</sup>. Além da disfunção ventricular esquerda, o paciente afetado também costuma apresentar restrição funcional do ventrículo direito. Isso ocasiona congestão das veias hepáticas (hipertensão venosa), que por sua vez pode causar hipóxia tecidual ou exacerbar os danos hepatocelulares<sup>60</sup>. Essa lesão hepática aguda, devido doença cardíaca é denominada de hepatite isquêmica ou fígado em choque ou hepatite hipóxica<sup>61</sup>. Após um período de sub-perfusão hepática, as transaminases hepáticas podem ficar acentuadamente elevadas (acima de 3000 UI/ml) como resultado da necrose<sup>61</sup>. Felizmente, na maioria dos casos o insulto cardíaco é abordado, a perfusão hepática é restaurada e o fígado resiliente se recupera rapidamente. Em casos graves, um paciente pode desenvolver insuficiência hepática aguda e eventualmente ir a óbito<sup>61</sup>. Tais alterações funcionais e morfométricas cardíaco, pulmonar e hepática decorrentes do infarto do miocárdio podem ser avaliados por diferentes modelos experimentais. Embora não represente a totalidade da fisiopatologia desta doença estes protocolos são assaz úteis para o estudo dos mecanismos envolvidos no estabelecimento do remodelamento cardíaco adverso pós-infarto.

#### 1.1.4 Modelos experimentais de lesão cardíaca (infarto)

Existem modelos experimentais de IAM que simulam alguns aspectos da evolução da doença no que diz respeito a parâmetros hemodinâmicos, ecocardiográficos e bioquímicos. A título de exemplificação, destacam-se duas relevantes técnicas de indução de infarto em modelo animal: a oclusão da coronária descendente anterior e a administração de isoproterenol.

O modelo de infarto do miocárdio experimental em ratos, pela oclusão da coronária descendente anterior foi descrito inicialmente por Heimbürger em 1946. Com o passar dos anos, a técnica foi modificada progressivamente por Johns e Olson em 1954 e Selve e cols. em 1960 e no início da década de 1980, o método foi introduzido no Brasil<sup>28</sup>. Após a anestesia é realizada toracotomia esquerda, entre o 4º e o 5º espaços intercostais. O coração é exteriorizado por compressão lateral do tórax e a artéria coronariana esquerda ligada com o fio de sutura 5-0 a, aproximadamente, 2 mm da origem, entre a borda do átrio esquerdo e o sulco da artéria pulmonar. A seguir, o coração é rapidamente recolocado na cavidade torácica, os pulmões expandidos com ventilação positiva com oxigênio a 100% e o tórax fechado. O método descrito acima possui várias vantagens. Em primeiro lugar, os animais podem ser criados especificamente para os protocolos e com custo mais baixo que animais maiores. Em segundo lugar, a cirurgia é extremamente rápida, com duração variando de 2 a 5 minutos. Outro aspecto é que devido às características do metabolismo, as etapas envolvidas na evolução do infarto como, por exemplo, necrose, cicatrização e remodelação ocorrem rapidamente, o que diminui o tempo de observação dos estudos. Finalmente, as alterações morfológicas e funcionais decorrentes do infarto se assemelham àquelas encontradas em humanos<sup>28</sup>.

O segundo modelo de lesão cardíaca que resulta em infarto do miocárdio, no presente estudo ressaltado, é aquele baseado na administração de isoproterenol. De modo geral, esta técnica de indução de infarto consiste na administração subcutânea de isoproterenol, numa dose de 150 mg/kg/dia diluída em 2 ml de solução salina, durante dois dias consecutivos, com

intervalo de 24 horas entre as aplicações<sup>34</sup>. O isoproterenol é um derivado sintético da noradrenalina, sendo um dos mais potentes agonistas beta-adrenérgico, porém com afinidade muito baixa para receptores alfa<sup>36</sup>. O infarto induzido pelo isoproterenol é causado por insuficiência coronariana aguda provocada pelo desequilíbrio entre a demanda energética do miocárdio (elevada pelo potente efeito cronotrópico positivo do isoproterenol) e o fluxo coronariano ao miocárdio. A hipóxia do miocárdio resulta, então, na necrose cardíaca. A elevação excessiva de cálcio intracelular e a formação de espécies reativas, com consequente indução de estresse oxidativo, estão envolvidas na indução da morte dos cardiomiócitos e lesões cardíacas causadas pelo isoproterenol<sup>37</sup>. Pesquisadores que utilizam essa técnica afirmam que este modelo tem as vantagens de baixo custo, fácil operação e boa repetibilidade<sup>34, 35,37</sup>. Porém, optou-se neste trabalho em utilizar o primeiro modelo descrito acima, por considerar melhor a padronização da região cardíaca infartada e não utilizar medicamento para induzir o infarto, e assim fazê-la mediante uma técnica cirúrgica.

## 1.2 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Espécies reativas de oxigênio (EROs) é um termo comum que identifica uma variedade de substâncias contendo oxigênio com reatividade com outras biomoléculas, com a finalidade de se estabilizar. Incluem radicais livres (substâncias contendo um ou mais elétrons não emparelhados) como superóxido, hidroxil, peroxil, e hidroperoxil e espécies não radicais livres como peróxido de hidrogênio e outros peróxidos<sup>15</sup>. No processo de respiração celular, o oxigênio recebe quatro elétrons, redução tetravalente, na cadeia transportadora de elétrons, resultando sua redução até água.

A formação de EROs ocorre em 2-5% de todo oxigênio que passa pelo processo de respiração celular das mitocôndrias<sup>16</sup>. Paralelamente ao termo EROs, as espécies reativas do nitrogênio (ERNs) identificam substâncias contendo nitrogênio e oxigênio também, como óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) radical livre, e substâncias derivadas do NO como oxinitrito. Essas moléculas são

constantemente formadas pelas células por reações enzimáticas ou não enzimáticas<sup>15</sup>(Figura 1).

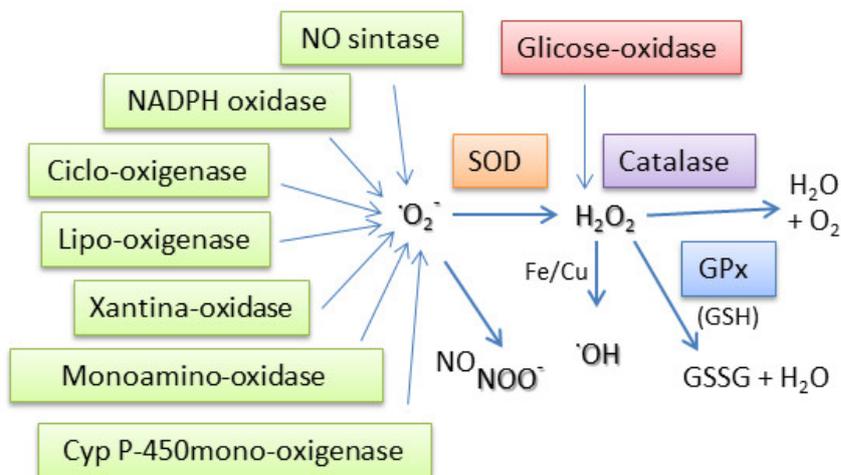


Figura 1. Formação de espécies reativas de oxigênio

Várias fontes podem gerar superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) que é rapidamente dismutado em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Superóxido também pode reagir com óxido nítrico (NO) para formar peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot -}$ ), resultando na inativação do NO. O peróxido de hidrogênio produzido a partir da desmutação de superóxido ou pela glicose oxidase é convertido em  $H_2O$  pela catalase e glutaciona peroxidase (GPx), mas, na presença de presença de ferro ou cobre, também pode produzir o radical hidroxila altamente reativo ( $\cdot OH$ ) pela reação de Fenton.

Retirado e adaptado de Vizcaino e colaboradores, 2001.

O radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) é o radical mais comum e abundante na célula, sendo formado pela cadeia transportadora de elétrons, por células fagocitárias e por reação de auto-oxidação. O radical superóxido é mais estável e apresenta seu tempo de meia-vida mais longo que o radical hidroxila. A enzima superóxido dismutase realiza a dismutação deste radical formando peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio não é considerado um radical livre, mas é considerado um ERO devido ao potencial de gerar radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), após reagir com metais de transição. Ainda, decorrente de sua baixa reatividade, o peróxido de hidrogênio é capaz de atravessar facilmente as membranas biológicas, agindo como sinalizador inter e intracelular<sup>16</sup>.

As reações de geração do radical hidroxila mediada pela interação metais- $\text{H}_2\text{O}_2$  foram descritas por Fenton e Haber-Weiss (Figura 2). O radical hidroxila mesmo tendo uma meia-vida curta, é o mais potente dos EROs, podendo reagir com praticamente todas as biomoléculas. Sua capacidade oxidante é superior a das demais EROs, porque o organismo não dispõe de sistema enzimáticos de defesa contra esse radical<sup>16</sup>.

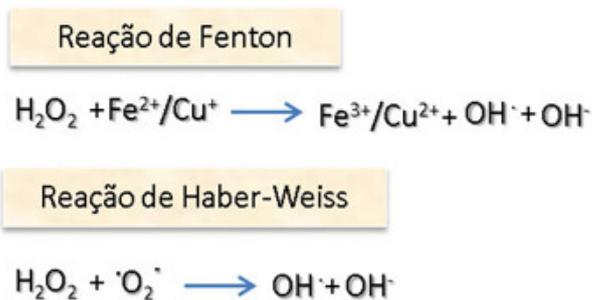


Figura 2. Geração do radical hidroxila mediada pela interação metais- $\text{H}_2\text{O}_2$

Retirado e adaptado de Haliwell, 2007.

Ainda neste contexto, outras fontes endógenas e exógenas de espécies reativas podem ser verificadas (Figura 3). No infarto do miocárdio, por exemplo, a formação dos radicais livres pode estar associada principalmente NADPH oxidase e xantina oxidase<sup>7,8</sup>. NADPH oxidase, óxido nítrico sintase indutível (iNOS) e xantina oxidase contribuem para a síntese de colágeno pós infarto do miocárdio<sup>30</sup>.

Para quantificar o aumento dos danos causados pelos radicais livres utilizamos marcadores de peroxidação lipídica em fluídos corporais. É importante lembrar que a peroxidação lipídica é um acompanhamento inevitável de morte celular<sup>6</sup>. Uma estratégia para evitar danos causados por radicais livres é fornecer moléculas que participam de eventos cuja disfunção leva ao estresse oxidativo e/ou fornecer moléculas que participam de mecanismos inatos de desintoxicação<sup>32</sup>. Uma maneira muito bem sucedida de usar antioxidantes vegetais é aumentar a concentração de substâncias endógenas que participam dos mecanismos de oxi-redução<sup>32</sup>.

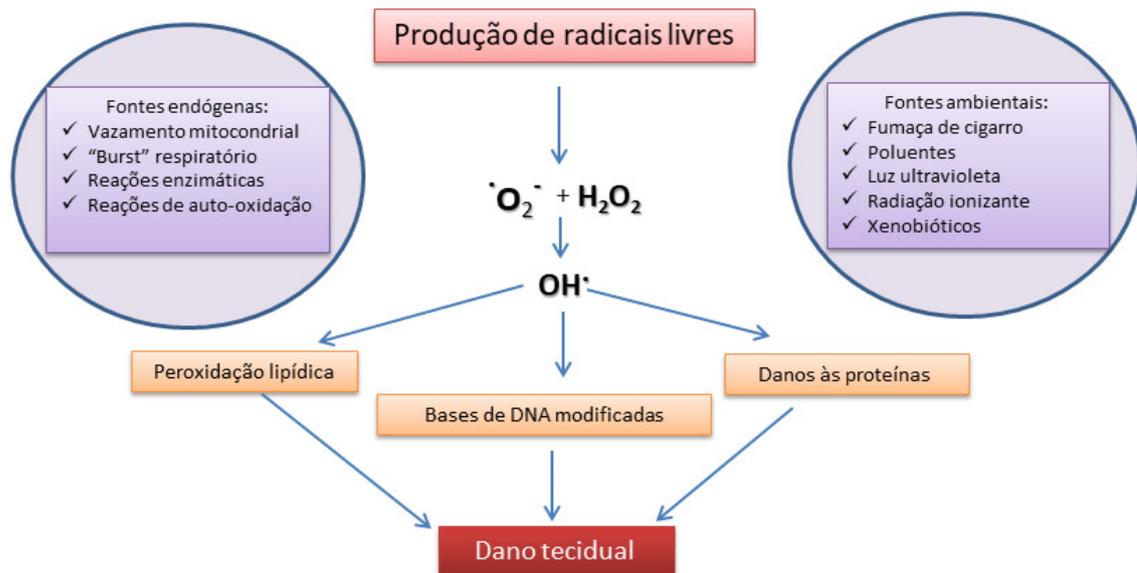


Figura 3. Principais Fontes de Espécies Reativas de Oxigênio e Consequentes Danos dos Radicais Livres.

Retirado e adaptado de Woodsite e colaboradores, 2001.

### 1.3 Antioxidantes

Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância que presente em baixas concentrações atua sobre um substrato oxidável, atrasando ou inibindo significativamente a oxidação deste substrato<sup>6</sup>. Como sugere esta definição o papel fisiológico dos antioxidantes é evitar danos aos componentes celulares de reações químicas envolvendo radicais livres. Atualmente, a palavra antioxidante é também utilizada para se referir às substâncias benéficas ao homem, geralmente fitoquímicos, devido suas capacidades relacionadas à reação redox<sup>12</sup>.

Como as espécies reativas de oxigênio têm a capacidade de reagir de maneira indiscriminada levando a danos a qualquer componente celular, para neutralizá-los possuímos sistemas antioxidantes enzimáticos constituídos pelo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutiona peroxidase (GPx)<sup>16</sup>. As superóxidos dismutases são metaloenzimas que dismutam o radical superóxido a oxigênio e peróxido de hidrogênio e constituem a primeira linha

de defesa contra os radicais livres. A catalase é uma enzima que atua na conversão de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. A catalase está presente principalmente nos peroxissomos, por isso seus níveis podem variar nos diferentes tecidos<sup>17</sup>. Com relação as glutathionas peroxidases (GPx) são uma família de enzimas homólogas a GPx-1 de mamíferos contendo em sua estrutura uma selenocisteína (Sec) e usa a glutathiona reduzida (GSH) como co-substrato obrigatório para redução do peróxido de hidrogênio na água<sup>32</sup>. A detoxificação de peróxidos pela GPx-1 de mamíferos ocorre por meio de um mecanismo enzimático do tipo “pingue-pongue” com dois substratos, no qual a cinética de saturação não é observada. Após reagir com o peróxido, um ácido selenênico (Se-OH) se forma no local ativo do seleno (Se-H) (Figura 4).

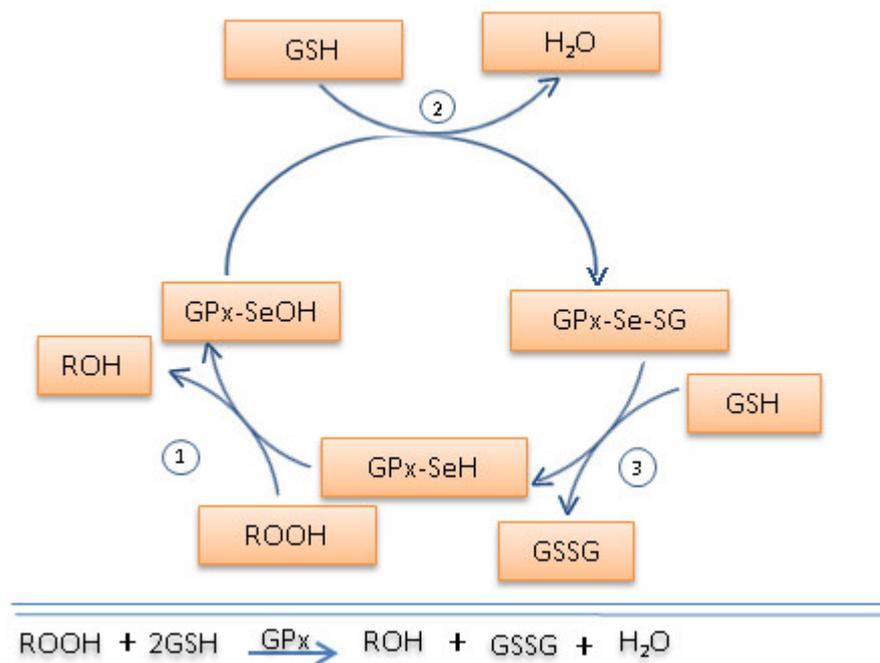


Figura 4. Redução do peróxido de hidrogênio pela GPX-1.

A inativação enzimática de peróxidos envolve a formação de modificações intermediárias na selenocisteína do local ativo. Assim, o selenol (GPx-SeH) forma um ácido selenênico (GPx-SeOH) após reagir com peróxidos (n.º 1 na figura). Uma molécula de GSH reduz o ácido selenênico, levando ao intermediário Se-SG (n.º 2 na figura) que é reduzido pela segunda GSH, resultando no GSSG (n.º 3 na figura). A reação líquida é mostrada na parte inferior da figura.

Retirado e adaptado de Lubos e colaboradores, 2011.

Na atividade enzimática da glutatona, há necessidade que a enzima glutatona redutase recicle glutatona oxidada (GSSG) em glutatona reduzida (GSH), usando NADPH como fonte de equivalentes redutores, e a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) mantêm as reservas celulares de NADPH<sup>32</sup>(Figura 5).

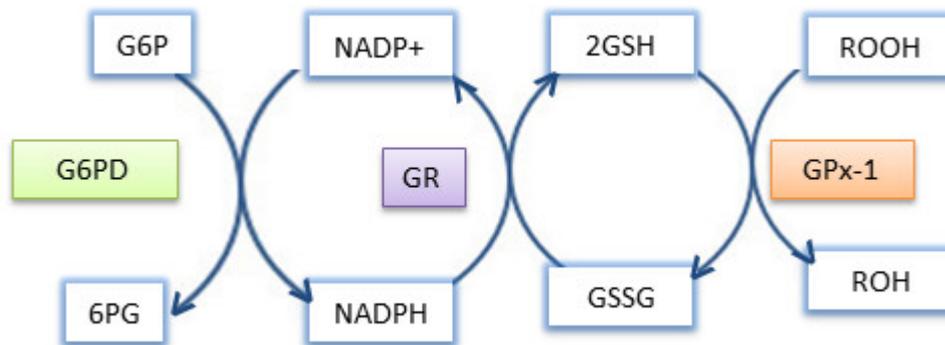


Figura 5. Caminhos redox envolvidos na manutenção dos cofatores necessários para ativação da GPx-1.

A GPx-1 inativa o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos às custas do GSH, que é oxidado para formar GSSG. A enzima glutatona redutase (GR) recicla GSSG em GSH utilizando NADPH como fonte de equivalentes redutores, enquanto a glicose-6-fosfato desidrogenase G6PD mantêm as reservas celulares de NADPH.

Retirado e adaptado de Lubos e colaboradores, 2011.

As peroxirredoxinas são uma família de enzimas com diferentes distribuição subcelulares. Encontramos algumas isoformas no citosol e interior das mitocôndrias e junto com as catalases são responsáveis pelo catabolismo do peróxido de hidrogênio<sup>32</sup>. Contamos também com o sistema tiorredoxina, formado pela tiorredoxina (Trx) pequena proteína redox de aproximadamente 12kDa expressa em todos os tecidos, a tiorredoxina redutase (TrxR) e um doador de elétrons, NADPH. A Trx é mantida em estado reduzido na presença de TrxR e NADPH<sup>33</sup>. Trx1, umas das principais isoformas do Trx, é expressa no coração de forma abundante e exerce sua atividade oxidorredutase através dos resíduos de cisteínas (Cys32 e Cys35) conservados, reduzindo as proteínas

oxidadas por meio de reações de troca de dissulfeto de tiol<sup>33</sup>. Trx1 interage com uma grande variedade de proteínas, incluindo fatores de transcrição e outras moléculas de sinalização, e regula inúmeras funções celulares. Isso inclui defesa contra o estresse oxidativo, transcrição de genes, crescimento celular, sobrevivência e morte celular e controle de qualidade de proteínas<sup>33</sup>.

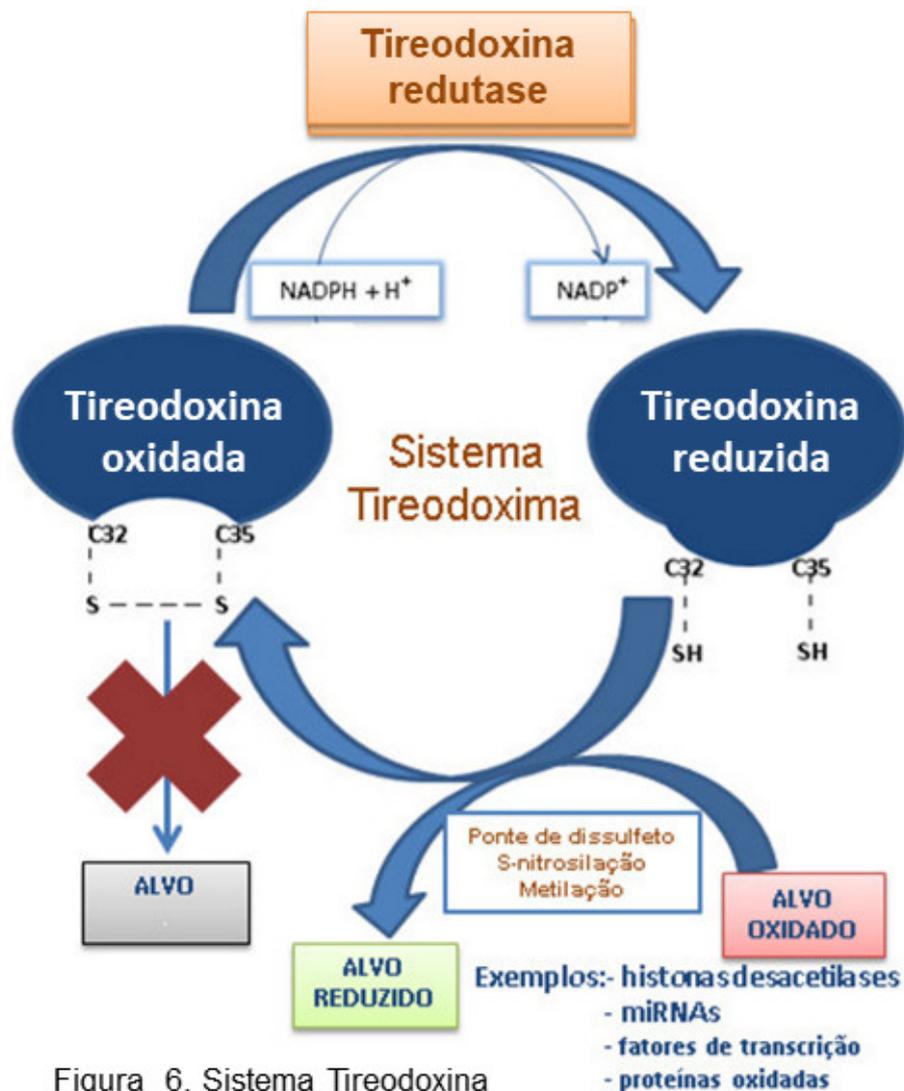


Figura 6. Sistema Tireodoxina

Trx1 reduzida com Cys32 e Cys35 livres pode interagir e reduzir moléculas alvo oxidadas com ligações dissulfeto. Embora essa reação produza Trx1 oxidada com uma ligação dissulfeto intramolecular entre Cys32 e Cys35, a Trx1 oxidada pode ser reduzida novamente (reciclada) por TrxR na presença do doador de elétrons, NADPH. Exemplos de alvos Trx1 incluem histona desacetilase 4 (HDAC4) e proteína quinase ativada por AMP (AMPK).

Retirado e adaptado de Nagarajan e colaboradores, 2017.

A Trx1 oxidada aceita um elétron do NADPH e é então reduzido pelo tireodoxina redutase (TrxR) para continuar o ciclo. Importante destacar que Trx1 reduzida interage com e redução da peroxirredoxina, que por sua vez converte  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água. Assim, a peroxirredoxina é um dos principais alvos de Trx1 e medeia talvez um dos mecanismos mais importantes de Trx1, a redução de peróxido de oxigênio<sup>33</sup> (Figura 6).

Resumidamente poderíamos destacar algumas reações enzimáticas envolvidas no processo de eliminação do estresse oxidativo (Figura 7).

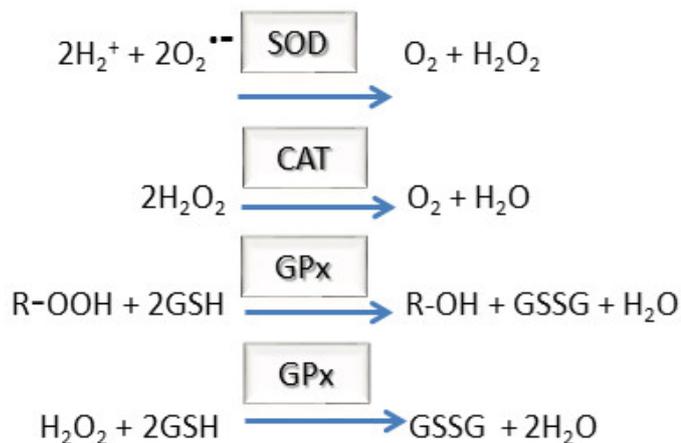


Figura 7. Reações das enzimas superóxido dismutase (**SOD**), catalase (**CAT**) e glutatona redutase (**GPx**).

Retirado e adaptado de Halliwell, 2007.

Além do sistema enzimático, os tecidos podem recrutar antioxidantes não enzimáticos, como por exemplo, glutatona reduzida, qual participa como substrato em muitas reações catalisadas pela glutatona peroxidase. As vitaminas, como alfa tocoferol, beta caroteno e o ascorbato, também podem atuar com antioxidantes, reduzindo as concentrações da espécies reativas, agindo como *scavenger*, ou absorvendo a energia de excitação dos radicais livres, tal qual um *quencher*<sup>16</sup>. Moléculas orgânicas que se inserem na dieta dos seres humanos também estão assumindo importante papel como antioxidantes, tais como os compostos fenólicos.

## 2. Estilbenoides

Ao longo do tempo, as plantas têm elaborado uma vasta gama de produtos naturais que evoluíram, conferindo vantagens seletivas contra ameaças ambientais. Desta forma, destacam-se os estilbenoides que juntamente com os flavonoides, compõem a classe dos compostos fenólicos. Estilbenoides possuem atividade antimicrobiana e sua síntese é estimulada em resposta a vários tipos de stress, tais como a luz ultravioleta (UV) e infecções fúngicas (nas folhas e cascas dos frutos). Por participarem da defesa das plantas são denominadas de fitoalexinas<sup>17</sup>.

O resveratrol foi o estilbenoide mais estudado na última década, e corresponde 3,5,4'-trihidroxi-trans-estilbeno, é encontrado principalmente nas cascas de uvas (*Vitaceae ssp.*). Outro estilbenoide em destaque é o pterostilbeno que corresponde (trans-3,5-dimetoxi-4-hidroxiestilbeno) é um composto fenólico naturalmente encontrado em uma ampla variedade de frutas principalmente em mirtilos (*Vaccinium spp.*)<sup>17</sup>(Figura 8).

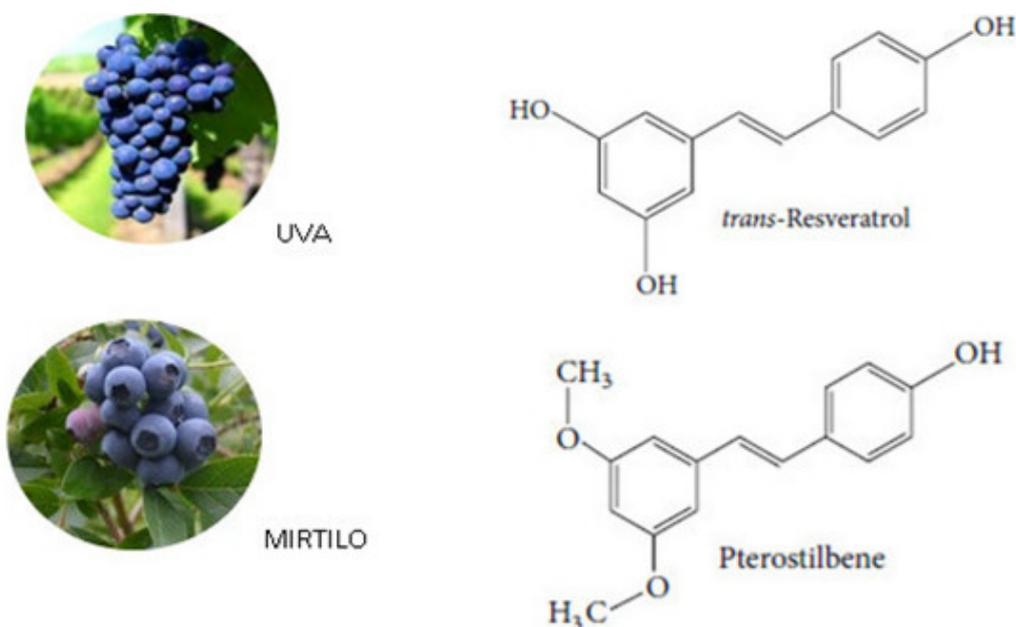


Figura 8. Estrutura química do resveratrol e pterostilbeno.

Retirado e adaptado de Reinisalo e colaboradores, 2015.

Embora o resveratrol seja bem tolerado em humanos, é pouco solúvel em água (<0,05 mg/mL), e é rapidamente metabolizado. A rápida

glucuronidação durante a conjugação da fase II resulta em baixa biodisponibilidade oral (aproximadamente 20%) e meia-vida próxima de 14 minutos<sup>41,42</sup>. Já o pterostilbeno com a posição três é metilada, é protegida da glucuronidação, exibe biodisponibilidade oral de 95% e meia-vida de 105 minutos<sup>41</sup>. O pterostilbeno é considerado metabolicamente mais estável em comparação ao resveratrol, pois possui apenas um grupo hidroxila livre disponível para a glucuronidação ou sulfatação<sup>42</sup>. Estudos farmacocinéticos mostraram altos níveis de metabólitos de estilbenos (sulfatos e glucuronídeos) no plasma. Portanto, alguns argumentam que esses metabólitos podem atuar como reservatórios para os estilbenoides sejam por ação direta dos metabólitos ou via reciclagem entero-hepática<sup>17</sup>. Os estilbenoides são principalmente excretados como metabólitos na urina (renal) e nas fezes (não renais). As vias não renais parecem predominar na eliminação do resveratrol e do pterostilbeno, sugerindo papel importante para o ciclo entero-hepático. Assim, os efeitos biológicos ainda podem ser atingidos com baixos níveis circulantes dos compostos estilbenoides originais<sup>17</sup>.

Os mecanismos de ação dos estilbenoides está relacionada à redução dos níveis de EROs como o peróxido de hidrogênio e íons superóxidos, bem como aumentar a disponibilidade intracelular de oxidantes enzimáticos e não-enzimáticos<sup>18</sup>. De um modo geral, vários polifenóis estão envolvidos na regulação de receptores nucleares. Kosuru e colaboradores demonstraram que o pterostilbeno protege as células de danos oxidativos através da via do fator nuclear eritroide relacionado ao fator 2 (Nfr2)<sup>43</sup>. Um estudo em vitro demonstrou que o pterostilbeno foi capaz de melhorar a expressão de genes antioxidantes através da ativação da via Nfr2, protegendo embriões de camundongos contra estresse oxidativo induzido pela adição de peróxido de hidrogênio<sup>44</sup>.

### 3. Fator nuclear eritróide relacionado ao fator 2 (Nrf2)

O Nrf2 pertence a uma grupo de fatores de transcrição de zíper de leucina básica (bZIP)<sup>20</sup>. Em condições basais, o Nrf2 se localiza no citoplasma celular associado a duas proteínas Keap1 (do inglês – Kelch-like ECH-associated

Proteín 1) também conhecido como inibidor natural do Nrf2 (iNrf2). O homodímero de Keap 1 serve de intermediário para a ligação do complexo Cul3-Rbx1 (do inglês – E3-ubiquitin ligase complex/Ringbox proteína 1) que marca por ubiquitinação o Nrf2 para degradação via proteassoma 26S. Assim, a quantidade de Nrf2 se mantém sempre baixa em condições fisiológicas<sup>21</sup>. Porém, quando a célula é exposta estímulos estressores como espécies ativas de oxigênio e nitrogênio, alguns resíduos de cisteínas em Keap1 são oxidados, resultando em alteração conformacional do Keap1 e consequente liberação de Nrf2. Nrf2 livres translocam-se para o núcleo e associam-se com as proteínas sMaf (do inglês – small musculoaponeurotic fibrosarcoma). Esse heterodímero se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE) ou ao elemento de resposta eletrofílica (EpRE), localizados na região promotora dos genes alvos. Assim o complexo Nrf2/sMaf, ao se ligar em ARE ou EpRE, iniciará o processo de transcrição<sup>22</sup>(Figura 9).

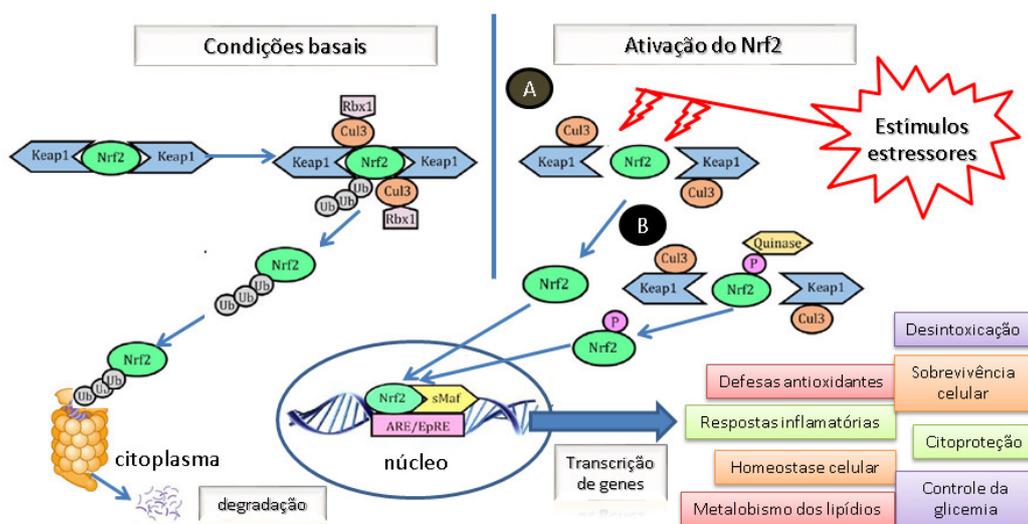


Figura 9. Modelo esquemático da via Nrf2/Keap1.

Em condições basais: o Nrf2 permanece no citoplasma associado com duas moléculas de Keap1. A associação com Keap1 permite que se forme um complexo com Cul3-Rbx1, que marca o Nrf2 para degradação via proteassoma. Em resposta a estímulos estressores: A) cisteínas reativas em Keap1 são oxidadas; B) proteínas quinases fosforilam diretamente o Nrf2. Ambas as formas de ativação suspendem o efeito inibitório de Keap1 e permitem que o Nrf2 fique livre para migrar para o núcleo e se ligar com sMaf e ARE/EpRE, promovendo a transcrição de genes envolvidos na defesa antioxidante, desintoxicação de drogas e xenobióticos, regulação do metabolismo, citoproteção e sobrevivência celular.

Retirado e adaptado de Niture e colaboradores, 2013.

O Nrf2 é considerado o regulador-chave da resposta antioxidante do organismo, sendo responsável por induzir a expressão de genes que codificam proteínas e enzimas antioxidantes, além de enzimas da fase II de detoxificação (conjugação) do metabolismo. Desta forma, o Nrf2 desempenha um mecanismo de importância crítica para a proteção e sobrevivência celular. Dentre os seus genes alvo estão a heme oxigenase 1 (HO-1), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), NAD(P)H quinona oxidoreductase 1 (NQO1), glutathione S transferase (GST), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), tioredoxina (Trx) e glutamato cisteína ligase (GCL)<sup>23</sup>. Por outro lado, a função do Nrf2 não se limita somente à resposta antioxidante e de detoxificação. Ele é responsável pela modulação da expressão de mais de 200 genes, que possuem importante papel em diversos outros processos celulares, incluindo resposta inflamatória, regulação metabólica, proliferação celular, senescência e função mitocondrial<sup>24</sup>.

A identificação de que o Nrf2 está relacionado com tantas outras funções, sendo expresso de forma ubíqua no organismo, sugere que ele funcione como um sensor celular que comanda uma reprogramação metabólica para combater os estímulos estressores, desta forma aumentando a capacidade de sobrevivência celular e restauração da homeostase<sup>25</sup>.

#### 4. Hormese

Provavelmente, um dos principais mecanismos antioxidantes exercidos por componentes das plantas – a hormese, ocorra despercebido. É indireto e contra intuitivo e consiste em impulsionar o mecanismo inato de defesa contra o estresse oxidativo<sup>45</sup>. A hormese é constituída por mecanismos que foram melhorados com a evolução. O desafio é identificar produtos derivados de plantas capazes de restaurar a eficácia desses mecanismos de proteção quando se tornam disfuncionais pelo envelhecimento ou pela doença<sup>45</sup>.

Por exemplo, a radiação ionizante (radioatividade), a exposição limitada é benéfica, enquanto a alta exposição é prejudicial<sup>45</sup>. Na terminologia do estresse biológico os conceitos de respostas adaptativas e pré-condicionamento incluem a relação dose-resposta da hormese. Baixas doses

de exposição ao agente estressor geralmente esta associado a um benefício positivo (eustresse) enquanto alta dose implica em dano e resposta negativa<sup>46</sup>. No caso, os efeitos da radiólise da água, aumentaram as concentrações milimolares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular, implicando em alterações redox imediatas, associadas ao estresse oxidativo.

As respostas eustresse neste caso podem ser divididas em: independentes que não requer ativação de genes com exemplo são Ca<sup>2+</sup>, ATP e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e óxido nítrico (NO) sintetizado por óxido nítrico sintase. Estes, por meio de processos controlados de sinalização, ativam comutadores moleculares de genes que expressam uma variedade de enzimas úteis na resposta redox. Dois dos principais comutadores moleculares em eucariotos são os Sistema Nrf2 / Keap1 e sistema NF-kB.

## 5. Hipótese

O infarto do miocárdio induz alterações oxidativas e morfológicas ao parênquima do pulmão, reestruturando a vasculatura e elevando a pressão da circulação pulmonar. Esta alteração na hemodinâmica provoca aumento da pós-carga e remodelamento do adverso do ventrículo direito e efeitos subsequentes sobre os tecidos remotos como aorta e fígado. Este prejuízo ao sistema cardiovascular e hepato-pulmonar é mitigado com a administração de compostos fenólicos, em especial, o pterostilbeno. Isso abre a oportunidade de uma nova alternativa terapêutica auxiliar para o remodelamento tecidual pós-infarto.

## 6. Objetivos

Avaliar as alterações na homeostase redox no tecido pulmonar, ventrículo direito, aorta e fígado durante a progressão da isquemia do miocárdio para insuficiência cardíaca em ratos Wistar com 60 dias de vida. Adicionalmente,

mensurar o impacto benéfico da administração do pterostilbeno como uma forma terapêutica alternativa.

#### 6.1 Objetivos específicos:

Avaliar o efeito do pterostilbeno sobre os seguintes marcadores de:

- Ecocardiográficos para identificar a condição de infarto do miocárdio.
- Aspectos morfométricos dos ventrículos direito e esquerdo, assim como do pulmão.
- Peroxidação lipídica e antioxidantes enzimáticos entre os grupos.
- Estresse oxidativo, mediante avaliação da razão da glutathionas oxidada e reduzida entre os grupos.
- A expressão proteica de Nrf2, óxido nítrico sintase (NOS) e xantina oxidase por Western Blot entre os grupos.
- A atividade da NADPH oxidase e da NOS total entre os grupos.

#### 7. Análise Estatística

Para avaliar a distribuição normal dos resultados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Teste paramétrico ANOVA de uma via será utilizado para comparação entre os grupos.

O teste de Tukey foi realizado para detectar diferenças entre os grupos. Diferenças serão consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Os resultados serão expressos com a média  $\pm$  DP. Os dados serão analisados usando o programa Sigma Stat (Jandel Scientific Co, v.11.0, San Jose, Ca, EUA).

## 8. Material e Métodos

### 8.1 Produtos químicos

O pterostilbeno e a ciclodextrina foram produzidos pela Changsha Organic Herb, China, e Roquette Freres, França, respectivamente. O pterostilbeno foi complexado com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina para aumentar sua solubilidade em água. Um estudo de Lacerda e colaboradores descreve a tecnologia farmacêutica usada para desenvolver a formulação de pterostilbeno+ciclodextrina<sup>26</sup>.

### 8.2 Aspectos Éticos

Os estudos com animais são regulamentados pela Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca) que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e pelas diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. A experimentação animal iniciou-se após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. (CEUA-UFRGS # 35451).

### 8.3 Origem dos animais

Após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA – UFRGS) foram requisitados ratos Wistar adultos machos com aproximadamente 60 dias de vida originários do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL – UFRGS).

## 8.4 Desenho experimental e grupos experimentais

O experimento foi realizado seguindo o desenho experimental da figura 10. Após a cirurgia os ratos foram alocados nos seguintes grupos: controle designado SHAM (6 animais); infartado designado MI (5 animais); infartado e tratado com pterostilbeno complexado com ciclodextrina (100 mg/kg/peso)<sup>26</sup>, designado MI+PS (6 animais). O tratamento com pterostilbeno foi realizado uma vez ao dia através de gavagem por 8 dias até o final do protocolo. No grupo SHAM e MI foram administrados uma solução aquosa contendo somente ciclodextrina por gavagem. A dose foi determinada previamente através de curva de dose utilizando concentrações de 0-25-50 e 100 mg/kg/peso<sup>27</sup>.

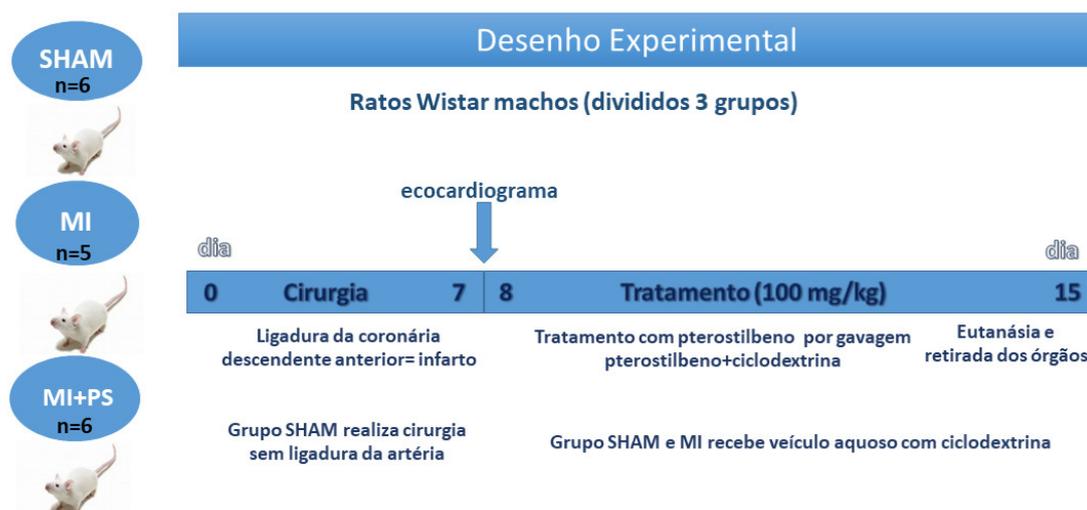


Figura 10. Esquema representativo do desenho experimental.

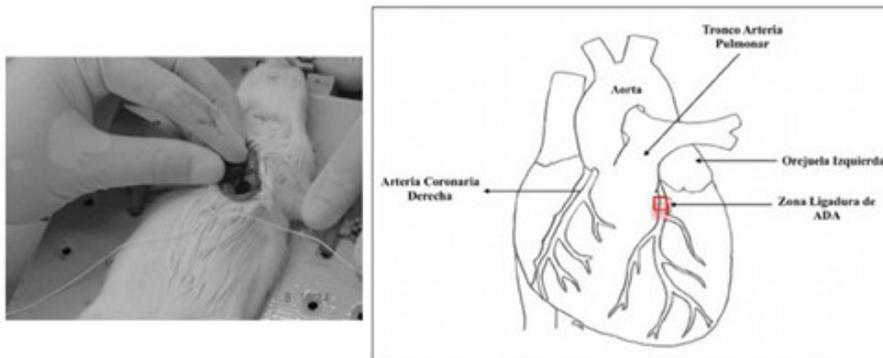
O tamanho da amostra utilizado neste trabalho foi calculado baseando-se em estudos prévios realizados pelo nosso laboratório e também em dados da literatura, os quais encontraram uma mortalidade pós-infarto de cerca de 10% dos animais nas primeiras 24 horas do período pós-cirúrgico (Lacerda e colaboradores, 2018)<sup>26</sup>.

## 8.5 Modelo de IAM pela oclusão da coronária descendente anterior

O modelo de infarto do miocárdio experimental em ratos, pela oclusão da coronária descendente anterior foi descrito inicialmente por Heimbürger em 1946. Com o passar dos anos, a técnica foi modificada progressivamente por Johns e Olson em 1954 e Seyle e cols. em 1960 e no início da década de 1980, o método foi introduzido no Brasil<sup>28</sup>.

Para isso, os animais foram mantidos anestesiados com quetamina (90 mg/kg) intraperitoneal e com volume de 0,45 ml para rato de 250g e xilazina (10 mg/kg), intraperitoneal e com volume de 0,12 ml para rato de 250g simultaneamente, conforme resolução normativa do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, 2016. Em seguida foi realizada toracotomia para acessar o coração conforme técnica cirúrgica e realizado o infarto por oclusão coronariana. Logo após, os animais foram retirados da ventilação artificial e foi estimulada a sua respiração espontânea. Os mesmos receberam 30.000 UI de benzilpenicilina benzatina (Penretard, Cibran, Tanguá, RJ, Brasil, intramuscular, injeção única) e foram tratados por três dias com o analgésico Flunixinina (2,5mg/kg, intramuscular, uma injeção diária) visando minimizar a dor e o desconforto no período pós-operatório. Após isso, foram colocados em ambiente aquecido para recuperação.

Os animais dos grupos SHAM foram submetidos à cirurgia a qual consistiu dos mesmos procedimentos cirúrgicos, com exceção da oclusão coronariana<sup>39</sup>. O infarto do miocárdio cirúrgico e a administração do pterostilbeno (complexado com ciclodextrina) foram realizados de acordo com estudos anteriores do nosso grupo. A taxa de mortalidade durante o procedimento de cirurgia de infarto foi de 10%.



**Figura 11. Cirurgia de ligadura da artéria descendente anterior.**

Retirado e adaptado de Zornoff e colaboradores, 2009.

## 8.6 Tratamento com pterostilbeno

Após avaliação do ecocardiograma começou o tratamento com pterostilbeno. Foi administrado por gavagem ao grupo MI+PS solução de pterostilbeno complexado a ciclodextrina 100mg/kg/peso por 8 dias preparação conforme descrito por Lacerda e colaboradores<sup>26</sup>. No grupo SHAM e MI foram administrados uma solução aquosa contendo somente ciclodextrina por gavagem.

## 8.7 Avaliação ecocardiográfica

Os animais foram submetidos à avaliação funcional por ecocardiografia, para avaliação da área do infarto do miocárdio após a cirurgia. As análises ecocardiográficas (catorze dias após o infarto) foram realizadas com o sistema Envisor Philips (Andover, MA, USA) com transdutor de alta frequência e alta resolução (12-3 MHz), e um operador treinado com experiência em ecocardiografia capturou as imagens<sup>38</sup>.

Os animais foram anestesiados (ketamina 90 mg/kg; xilazina 20 mg/kg, i.p.) e colocados em decúbito lateral para obtenção das imagens. As imagens do ventrículo esquerdo (LV) foram avaliadas em três planos: basal, médio e apical. As frações de encurtamento do ventrículo (FS) foram obtidas utilizando a seguinte equação:  $LVFS = \frac{DD - SD}{DD} \times 100$  (diâmetro diastólico – DD; diâmetro sistólico SD). O volume sistólico final do ventrículo esquerdo (ESV) e o volume diastólico final (EDV) foram medidos conforme descrito previamente<sup>38,39</sup>. O débito sistólico (SO) foi calculado como  $SO = EDV - ESV$ <sup>40</sup>. Em cada plano transversal ecocardiográfico (basal, médio e apical) o arco correspondente aos segmentos infartados (regiões ou segmentos do miocárdio mostrando uma das seguintes alterações na cinética cardíaca: acinesia do movimento sistólico e/ou região com hipocinesia – RAH) indicam o perímetro infartado<sup>38,39</sup>.

#### 8.8 Tecidos retirados e análises realizadas

Após a eutanásia dos animais, foi realizado o procedimento de retirada dos órgãos, identificação e congelamento dos tecidos de interesse ao estudo, para posteriores análises morfométricas e de estresse oxidativo (Quadro 1). O congelamento inicial foi realizado de maneira instantânea com nitrogênio líquido, logo após, mantidos no freezer a temperatura – 80 °C, sendo descongelados pequenas amostras destes tecidos quando realizados as análises propostas.

Quadro 1. Tecidos retirados e análises realizadas

Tecidos	VENTRÍCULOS				
	VD	VE	PULMÃO	AORTA	FÍGADO
a) Análises ecocardiográficas		x			
b) Análises morfométricas	x	x	x		
c) Avaliação do estresse oxidativo:					
Espécies reativas totais – (ROS)	x		x	x	x
Peroxidação lipídica – (TBARS)			x		x
Superóxido dismutase – (SOD)			x		
Catalase – (CAT)			x		
Glutaciona peroxidase – (GPx)			x		
Glutaciona –S–transferase (GST)					x
NADPH oxidase	x			x	
Óxido nítrico sintase – NO sintase	x				
– <i>Sistemas das glutationas</i>					
Grupos sulfidrilas – (SH)	x		x	x	x
Glutaciona totais			x		
Glutaciona oxidada – (GSSG)			x		
Glutaciona reduzida – (GSH)			x		
Relação GSSG/GSH			x		
d) Expressão proteica (Western Blot)					
Imunodeteccção Nrf2			x		
Imunodeteccção xantina oxidase	x			x	
e) Dosagens complementares					
Proteínas totais	x		x	x	x
Dosagem de hemoglobina			x		

### 8.9 Análises morfométricas do ventrículo direito, esquerdo e pulmões

Os pulmões, ventrículos direito e esquerdo foram utilizados para medidas morfométricas e bioquímicas<sup>46</sup>. O pulmão esquerdo foi utilizado para determinar a razão pulmão/peso corporal, a fim de avaliar a congestão pulmonar. E para realizar os índices de hipertrofia dos ventrículos direito e esquerdo, foram calculados as razões ventrículo/peso corporal e ventrículo/comprimento da tibia<sup>47</sup>.

### 8.10 Preparação do homogeneizado do pulmão e ventrículo direito

O pulmão direito foi preparado para análise de estresse oxidativo para espécies reativas de oxigênio total, peroxidação lipídica, glutathiona total, glutathiona reduzida, concentração de tiol, atividade de enzimas antioxidantes e expressão da proteína Nrf2.

O ventrículo direito foi homogeneizado para avaliar as atividades da NADPH oxidase e do óxido nítrico sintase, os níveis de sulfidrilas e imunoconteúdo da xantina oxidase.

### 8.11 Preparação do homogeneizado da aorta e do fígado

A aorta foi preparada para análise de estresse oxidativo para espécies reativas de oxigênio total, os níveis de sulfidrilas, a atividade de NADPH oxidase, a atividade do óxido nítrico sintase e imunoconteúdo da xantina oxidase. O fígado foi homogeneizado para avaliar as espécies reativas de oxigênio total, peroxidação lipídica, atividade da glutathiona transferase e níveis do sulfidrilas.

### 8.12 Avaliação do estresse oxidativo

No tecido pulmonar, a concentração de espécies reativas de oxigênio totais (ROS Total) foi determinada pelo método de fluorescência através da reação com diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, EUA). Os dados foram demonstrados em pmol/mg de proteína<sup>48</sup>. A peroxidação lipídica foi medida pela reação de produtos de oxidação com as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), gerando um composto colorido, cuja

absorbância foi lida a 535 nm. Os resultados foram representados como nmol/mg de proteína<sup>49</sup>.

### 8.13 Atividade da NADPH Oxidase

A atividade da enzima NADPH oxidase foi realizada por ensaio espectrofométrico, através da avaliação do consumo de NADPH a 340 nm<sup>51</sup>. Os dados foram mostrados como nanomoles de NADPH por minuto por miligrama de proteína (nmol/min/mg de proteína).

### 8.14 Determinação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada através da inibição da auto-oxidação do pirogalol, e os resultados foram expressos como unidades SOD/mg de proteínas<sup>52</sup>. A avaliação da atividade da catalase (CAT) foi baseada no consumo de peróxido de hidrogênio e o decaimento da absorbância foi observado a 240 nm<sup>53</sup>. Os dados foram expressos como proteína pmol/min.mg.

A atividade da glutathione peroxidase (Gpx) foi estimada a partir da oxidação do NADPH, que foi acoplada à reação de reciclagem da GSSG para GSH, avaliada a 340 nm. Os valores foram demonstrados como nmol/mg de proteínas<sup>54</sup>.

A atividade da glutathione-S-transferase (GST), dosada nos homogeneizados do fígado dos grupos, foi determinada segundo o método de Habig e colaboradores, usando 1-cloro-2, 4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato<sup>95</sup>. As concentrações da GST foi expressa como  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína. A concentração de proteína foi medida pelo método de Lowry<sup>56</sup>.

A quantidade de grupos sulfidríla total, no tecido pulmonar e ventrículo direito foram determinados de acordo com Sedlak e Lindsay, através da reação do

grupo tiol com DTNB. A concentração de grupos sulfidríla total foi expressa como nmol TNB /mg de proteína<sup>55</sup>. A concentração de proteína foi medida pelo método de Lowry<sup>56</sup>.

Os níveis de glutathiona total e glutathiona oxidada (GSSG) foram determinados pelo método proposto por Akerboom e Sies, onde ocorre a redução de 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) pelo fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) catalisado pela glutathiona redutase<sup>50</sup>. Na dosagem da glutathiona oxidada, o sobrenadante da amostra foi neutralizado com hidróxido de potássio (2mol/L) e inibido pela adição de N-etilmaleinida (5  $\mu$ mol/L), posteriormente lido em filtro de 420 nm de absorbância. Os valores da glutathiona reduzida (GSH) foram determinados a partir da diferença entre a glutathiona total e a glutathiona oxidada. Os dados foram mostrados como  $\mu$ mol/min/mg de tecido<sup>50</sup>.

#### 8.15 Atividade da enzima óxido nítrico sintase

A atividade da enzima óxido nítrico sintase foi avaliada medido a conversão da oxihemoglobina (HbO<sub>2</sub>) em metemoglobina, induzida pela presença de óxido nítrico<sup>57</sup>. Os valores foram expressos como proteína nmol NO/min.mg.

#### 8.16 Análise da expressão proteica do Nrf2 e xantina oxidase

Os imunoconteúdos da Nrf2 e xantina oxidase foram determinados por Western Blot, conforme descrito por de Castro e colaboradores<sup>58</sup>. As membranas foram processadas para imunodeteção utilizando anticorpos primários (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) para Nrf2 (57 kDa) e xantina oxidase (150 kDa). Para detectar os anticorpos primários foram utilizados anticorpos secundários de acordo com a origem dos anticorpos primários que podem ser (“anti-rabbit”, “anti-mouse” ou “anti-goat”). Neste trabalho utilizamos anticorpo secundário “anti-rabbit”, conjugados com peroxidase”.

As membranas foram reveladas por quimioluminescência. As autorradiografias geradas foram medidas usando um programa densitômetro (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences Europe, IT). As bandas de pesos moleculares Nrf2 e xantina oxidase foram determinadas como referência um marcador de peso molecular padrão (RPN 800 arco-íris gama completa Rad, CA, EUA). Os resultados foram normalizados pelo método de vermelho de Ponceau<sup>58</sup>.

### 8.17 Descarte de materiais biológicos e químicos

Resíduos biológicos foram identificados e acondicionados em sacos brancos assim como as carcaças de animais mortos, então guardados em freezer específico para acondicionamento de carcaças. Com dia marcado, os sacos brancos são levados para os tonéis da empresa especializada no serviço de coleta de materiais biológico da UFRGS que faz o recolhimento desses descartes.

Os materiais tóxicos foram usados na capela e encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para sua correta eliminação. Todos os procedimentos com animais e análises posteriores foram realizados com uso de avental e luvas cirúrgicas respeitando os cuidados tanto para os animais como para os pesquisadores.

## 9. Resultados

### 9.1 Avaliação ecocardiográfica do ventrículo esquerdo

Dados das ecocardiografias avaliando os parâmetros morfológicos do ventrículo esquerdo, ambos os grupos infartados apresentaram aumento no volume sistólico final e diastólico final em comparação com os animais SHAM, indicando dilatação ventricular. No entanto, os animais MI+PS apresentaram um aumento menor no volume sistólico final em relação ao MI. O débito

sistólico e a frequência cardíaca não foram diferentes entre os grupos. O encurtamento fracionário do ventrículo esquerdo, que é um parâmetro da contratilidade, diminuiu em ambos os grupos infartados em relação aos animais SHAM, indicando piora da função sistólica dessa câmara e a administração de pterostilbeno não foi eficaz para melhorar esse parâmetro. Em relação ao perímetro infartado, não houve diferença em relação a esse parâmetro entre os grupos MI e MI+PS (Tabela 1).

**Tabela1. Avaliação ecocardiográfica do ventrículo esquerdo.**

	SHAM (n=6)	MI (n=5)	MI+PS (n=6)
LVESV (ml)	0.08±0.05	0.46±0.15 <sup>a</sup>	0.32±0.06 <sup>a b</sup>
LVEDV (ml)	0.29±0.09	0.68±0.14 <sup>a</sup>	0.57±0.06 <sup>a</sup>
Volume sistólico (ml)	0.21±0.04	0.22±0.03	0.24±0.04
Frequência cardíaca (b.p.m)	249±16	242±15	237±27
Fração de ejeção (%)	51.5±5.4	15.8±1.7 <sup>a</sup>	17.0±2.9 <sup>a</sup>
Perímetro do infarto (cm)	---	1.81±0.45	1.60±0.22

Dados expressos: média ± desvio padrão. Teste de Tukey foi realizado para detectar diferenças os grupos. <sup>a</sup> representa diferença em relação ao grupo SHAM p<0,05; <sup>b</sup> representa diferença relação ao grupo MI p<0,05. LVESV = volume sistólico final do VE. LVEDV = volume diastólico final do VE.

## 9.2 Análises morfométricas do pulmão, ventrículo direito e esquerdo

Foram aferidos os dados morfométricos dos pulmões e ventrículos (direito e esquerdo) conforme descrito na tabela 2.

Em termos de congestão pulmonar, os ratos infartados do grupo MI, apresentaram um aumento neste parâmetro em comparação com os animais SHAM (p<0,05). Os ratos infartados tratados com pterostilbeno, grupo MI+PS, não apresentaram congestão pulmonar, quando comparado com o grupo SHAM.

O peso dos ventrículos não apresentou diferenças entre os grupos experimentais (SHAM, MI, MI+PS). Da mesma forma, não houve alterações

nos índices de hipertrofia dos ventrículos, esquerdo e direito. Esses índices podem ser obtidos de maneira direta, através da relação massa do ventrículo/ peso do animal ou de maneira indireta, massa do ventrículo /tamanho da tibia.

**Tabela 2. Resultados morfométricos dos pulmões e ventrículos direito e esquerdo.**

	SHAM (n=6)	MI (n=5)	MI+PS (n=6)
Pulmão/peso corpo (g/g)	4.01±0.99	5.99±0.44 <sup>a</sup>	5.24±1.21
Ventrículo Direito – VD (g)	0.17±0.037	0.20±0.02	0.24±0.07
VD/tamanho tibia (g/cm)	0.48±0.09	0.57±0.07	0.66±0.19
VD/peso do corpo (mg/g)	0.50±0.11	0.60±0.04	0.70±0.23
Ventrículo Esquerdo – VE (g)	0.75±0.06	0.75±0.08	0.73±0.07
VE/tamanho tibia (g/cm)	2.05±0.19	2.09±0.22	2.00±0.18
VE/peso do corpo (mg/g)	2.15±0.24	2.21±0.22	2.11±0.15

Dados expressos: média ± desvio padrão. Teste de Tukey foi realizado para detectar diferenças entre os grupos. <sup>a</sup> representa diferença em relação ao grupo SHAM p<0,05. VD = ventrículo direito VE = ventrículo esquerdo

### 9.3 Papel do estresse oxidativo no tecido pulmonar de animais infartados e o impacto do tratamento com pterostilbeno

As análises do estresse oxidativo pulmonar apontaram um aumento das espécies reativas de oxigênio totais do grupo infartado tratado com pterostilbeno (MI+PS) em comparação aos grupos, infartado (MI) e controle (SHAM) (p<0,05; valores estatísticos p=0,048, F=8,008 e R quadrado=0,5336) (Figura 12A). No entanto, não foram observadas diferenças entre os grupos MI e SHAM.

Embora espécies reativas de oxigênio totais estivessem aumentadas no grupo MI+PS, a peroxidação lipídica ficou diminuída nos pulmões desses animais comparados com o grupo infartado – MI (p<0,05; valores estatísticos p=0,0273 F=4,712 e R quadrado=0,4023) (Figura 12B).

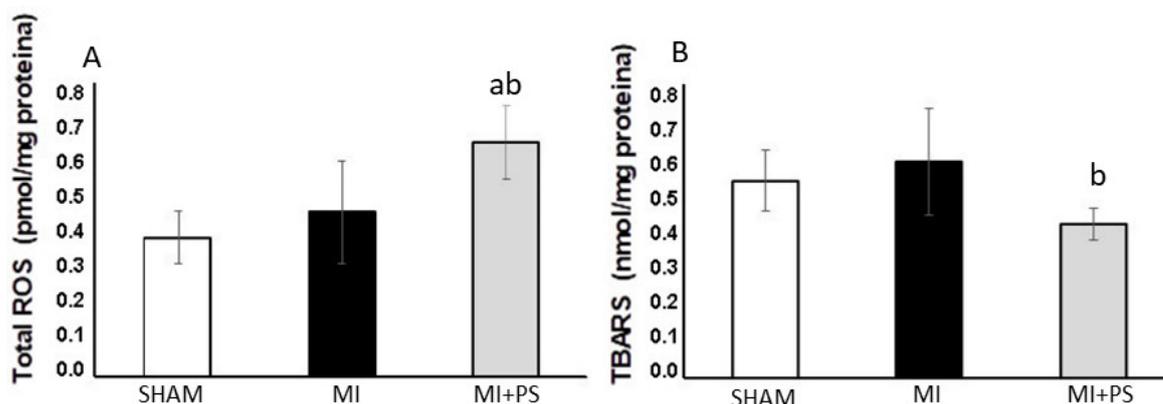


Figura 12. Avaliação do estresse oxidativo pulmonar de animais submetidos ao infarto do miocárdio que receberam injeção de pterostilbeno ou ciclodextrina durante 8 dias. A) Concentração de espécies reativas de oxigênio totais. B) Peroxidação lipídica.

Dados expressos: média  $\pm$  desvio padrão. Teste de Tukey foi realizado para detectar diferenças entre os grupos. <sup>a</sup> representa diferença em relação ao grupo SHAM  $p < 0,05$ . <sup>b</sup> representa diferença em relação ao grupo MI  $p < 0,05$ .

A seguir temos os resultados da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e do grupo sulfidrilas totais (-SH) no tecido pulmonar. Na figura 13A, a atividade da SOD foi reduzida no grupo infartado – MI comparado com o grupo controle – SHAM. No entanto, essa atividade foi recuperada pela administração do pterostilbeno ( $p < 0,05$ ; valores estatísticos  $p = 0,0274$   $F = 4,704$  e  $R \text{ quadrado} = 0,4732$ ).

A catalase (CAT) (Figura 13B), teve atividade aumentada no grupo infartado tratado com pterostilbeno (MI) em relação ao SHAM e também em relação ao grupo infartado (MI) ( $p < 0,05$ ; valores estatísticos  $p = 0,0056$   $F = 7,674$  e  $R \text{ quadrado} = 0,5230$ ). Tanto a atividade da glutathiona peroxidase (GPx) quanto os níveis de sulfidrilas totais (SH), no entanto, não mudaram entre os grupos (Figuras 13C e 13D, respectivamente).

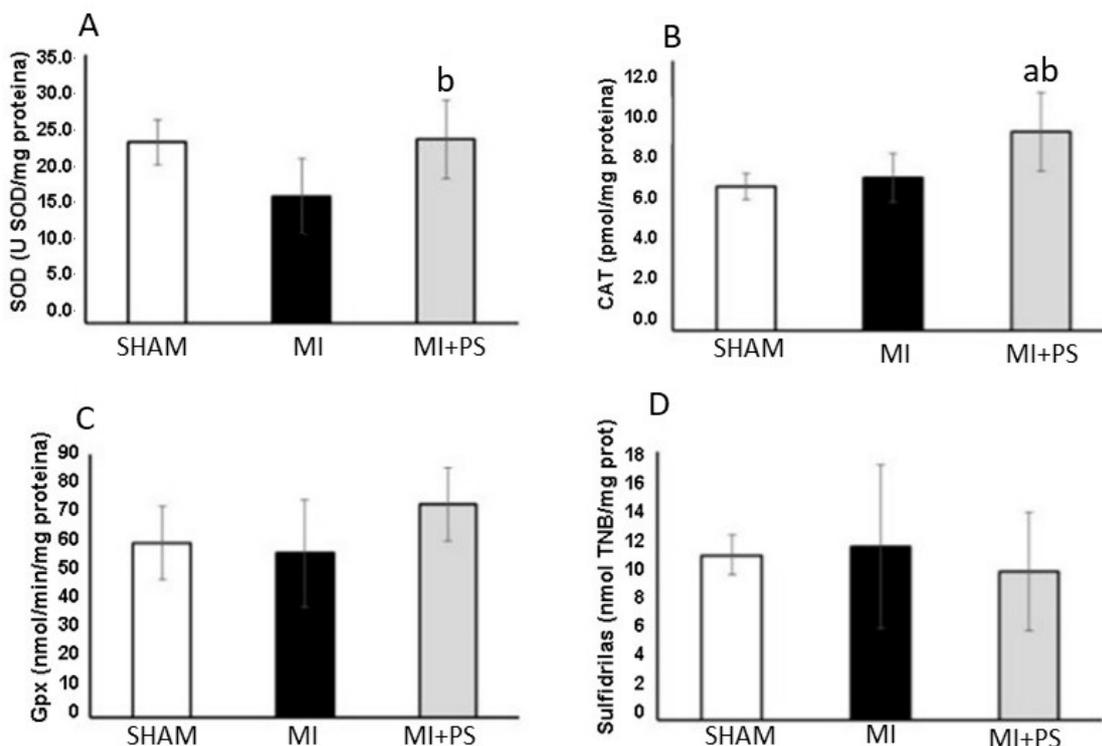


Figura13. Avaliação da atividade antioxidante pulmonar de animais submetidos ao infarto do miocárdio que receberam injeção de pterostilbeno ou ciclodextrina durante 8 dias. A)Atividade da superóxido dismutase. B)Atividade da catalase. C)Atividade da glutathiona peroxidase. D)Sulfidrilas totais.

Dados expressos: média  $\pm$  desvio padrão. Teste de Tukey foi realizado para detectar diferenças entre os grupos. <sup>a</sup> representa diferença em relação ao grupo SHAM  $p < 0,05$ . <sup>b</sup> representa diferença em relação ao grupo MI  $p < 0,05$ .

Em termos de defesas antioxidantes não-enzimáticas, não houve diferenças significativas no grupo infartado (MI) com relação ao grupo SHAM nos níveis de glutathiona reduzida (GSH). No entanto, em relação a este parâmetro, o pterostilbeno demonstrou um efeito positivo nos pulmões dos grupos de animais tratados (MI+PS) conforme dados expressos na tabela 3 ( $p < 0,05$ ).

Mesmo assim, os níveis de glutathiona oxidada (GSSG) e a proporção GSH/glutathiona total e não apresentaram diferenças entre todos os grupos experimentais.

**Tabela 3. Parâmetros redox nos pulmões.**

	SHAM (n=5)	MI (n=5)	MI+PS (n=6)
GSH	0.79±0.07	0.67±0.05	0.86±0.14 <sup>b</sup>
GSSG	0.24±0.09	0.46±0.20	0.36±0.14
Glutathionas totais	1.27±0.13	1.40±0.22	1.55±0.33
GSH/glutathionas totais	0.63±0.11	0.49±0.12	0.57±0.15

Dados expressos: média ± desvio padrão. Teste de Tukey foi realizado para detectar diferenças entre os grupos. <sup>b</sup> representa diferença em relação ao grupo MI p<0,05. GSH = glutathiona reduzida GSSG = glutathiona oxidada (unidade = µmol/min/mg tecido).

Com relação à expressão do Nrf2, cuja imunodeteção foi realizada por western blot, o tratamento com pterostilbeno, grupo MI+PS, promoveu aumento significativo na expressão da proteína Nrf2 comparado com o grupo infartado (MI) (p<0,05). Não foi encontrada diferença entre o grupo SHAM e infartado (MI) (Figura 14).

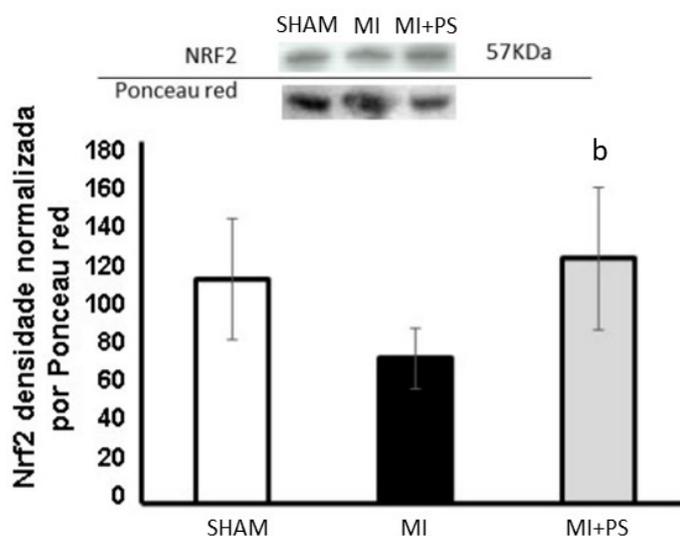


Figura14. Imunoconteúdo da proteína Nfr2 no tecido pulmonar de animais submetidos ao infarto do miocárdio que receberam injeção de pterostilbeno ou ciclodextrina durante 8 dias.

As densidades foram mensuradas por Western blot e normalizadas pela densidade do Ponceau red. <sup>b</sup> representa diferença em relação ao grupo MI p<0,05.

#### 9.4 Papel do estresse oxidativo no ventrículo direito de animais infartados e o impacto do tratamento com pterostilbeno

As espécies reativas de oxigênio totais foram quantificadas no ventrículo direito e não apresentaram diferenças entre os grupos (SHAM, MI e MI+PS) (Figura15).

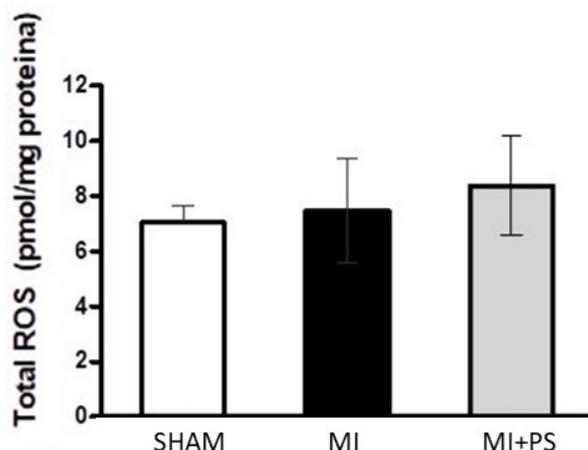


Figura 15. Concentração de espécies reativas de oxigênio totais no ventrículo direito de animais submetidos ao infarto do miocárdio que receberam injeção de pterostilbeno ou ciclodextrina por 8 dias.

Dados expressos: média  $\pm$  desvio padrão. Teste de Tukey foi realizado para detectar diferenças entre os grupos.

Com relação à concentração de sulfidrilas (grupo tiol relevante como antioxidante não enzimático) diminuiu no grupo infartado (MI) ( $p < 0,05$ ); no entanto, recuperou completamente no grupo infartado tratado com pterostilbeno ( $p < 0,05$ ; valores estatísticos  $p = 0,0554$   $F = 3,584$  e  $R$  quadrado =  $0,3386$ ) (Figura 16).

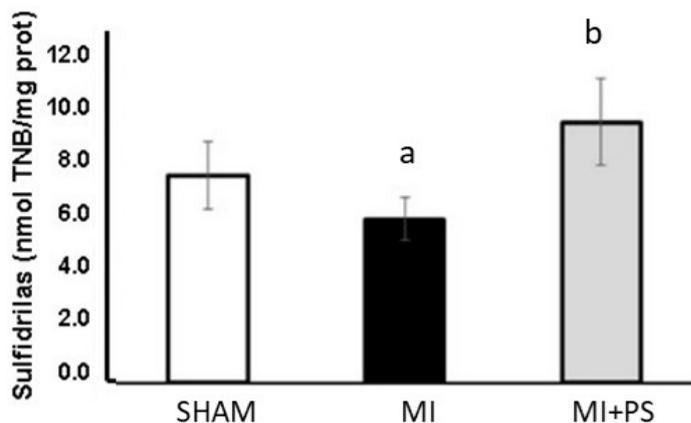


Figura16. Grupo sulfidrilas no ventrículo direito de animais submetidos ao infarto do miocárdio que receberam injeção de pterostilbeno ou ciclodextrina durante 8 dias.

Dados expressos: média  $\pm$  desvio padrão. Teste de Tukey foi realizado para detectar diferenças entre os grupos. <sup>a</sup> representa diferença em relação ao grupo SHAM  $p < 0,05$ . <sup>b</sup> representa diferença em relação ao grupo MI  $p < 0,05$ .

A atividade da NADPH oxidase aumentou no grupo infartado em relação ao grupo SHAM ( $p < 0,05$ ), porém após tratamento o grupo infartado que utilizou pterostilbeno (MI+PS) diminuiu a atividade da NADPH oxidase ( $p < 0,05$ ; valores estatísticos  $p = 0,0074$   $F = 7,108$  e  $R$  quadrado =  $0,5038$ ) (Figura17).

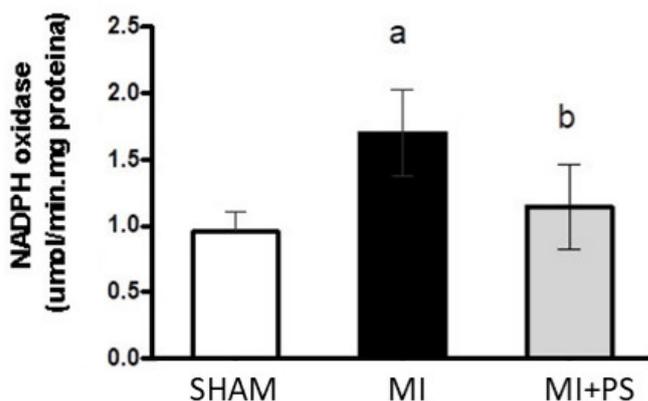


Figura 17. Atividade da NADPH oxidase no ventrículo direito de animais submetidos ao infarto do miocárdio que receberam injeção de pterostilbeno ou ciclodextrina durante 8 dias.

Dados expressos: média  $\pm$  desvio padrão. Teste de Tukey foi realizado para detectar diferenças entre os grupos. <sup>a</sup> representa diferença em relação ao grupo SHAM  $p < 0,05$ . <sup>b</sup> representa diferença em relação ao grupo MI  $p < 0,05$ .

O grupo infartado não tratado apresentou reduzida atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS), comparado ao grupo SHAM ( $p < 0,05$ ; valores estatísticos  $p = 0,0192$   $F = 5,316$  e  $R$  quadrado  $= 0,4316$ ) (Figura 18). Já o grupo tratado MI+PS não apresentou nenhuma mudança na atividade da NOS em comparação grupos SHAM e ao MI.

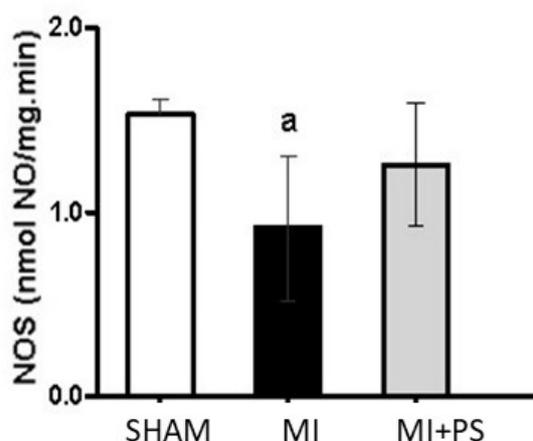


Figura 18. Atividade da óxido nítrico sintase no ventrículo direito de animais submetidos ao infarto do miocárdio que receberam injeção de pterostilbeno ou ciclodextrina durante 8 dias.

Dados expressos: média  $\pm$  desvio padrão. Teste de Tukey foi realizado para detectar diferenças entre os grupos. <sup>a</sup> representa diferença em relação ao grupo SHAM  $p < 0,05$ .

A imunodeteção da proteína xantina oxidase do ventrículo direito foi realizada nos grupos por western blot. O grupo infartado teve um aumento da expressão da xantina oxidase em relação ao grupo SHAM ( $p < 0,05$ ), no ventrículo direito. (Figura 19). Entretanto, o tratamento com pterostilbeno (MI+PS) apresentou um resultado intermediário, pois o imunocontéudo da xantina oxidase foi similar não somente ao grupo SHAM, mas também ao grupo infartado.

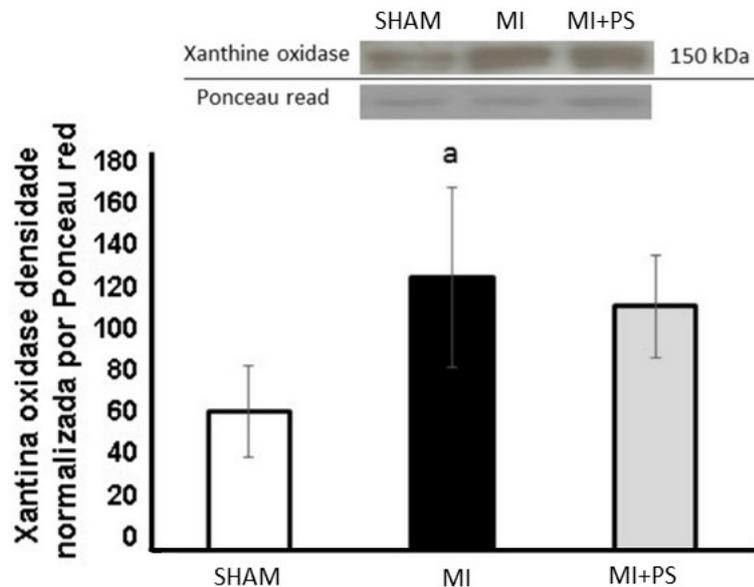


Figura19. Imunoconteúdo da proteína xantina oxidase no ventrículo direito de animais submetidos ao infarto do miocárdio que receberam injeção de pterostilbeno ou ciclodextrina durante 8 dias. As densidades foram mensuradas por Western blot e normalizadas pela densidade do Ponceau red. <sup>a</sup> representa diferença em relação ao grupo SHAM  $p < 0,05$ .

#### 9.5 Alterações das concentrações das espécies reativas e sua produção pela NADPH oxidase na Aorta

As espécies reativas de oxigênio totais na aorta foram mensuradas e não apresentaram diferenças entre os grupos (SHAM, MI e MI+PS) (Figura 20).

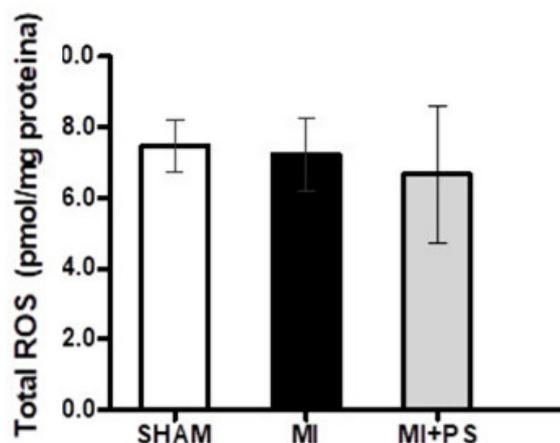


Figura 20. Concentração de espécies reativas de oxigênio totais na artéria aorta de animais submetidos ao infarto do miocárdio que receberam injeção de pterostilbeno ou ciclodextrina durante 8 dias.

Dados expressos: média  $\pm$  desvio padrão. Teste de Tukey foi realizado para detectar diferenças entre os grupos.

Ao analisarmos a atividade da NADPH oxidase no tecido aórtico, verificou-se diferença entre o grupo infartado comparado ao SHAM ( $p < 0,05$ ), assim como diferença em relação ao grupo infartado tratado com pterostilbeno ( $p < 0,05$ ; valores estatísticos  $p < 0,001$   $F = 30,38$  e  $R$  quadrado =  $0,8237$ ) (Figura 21).

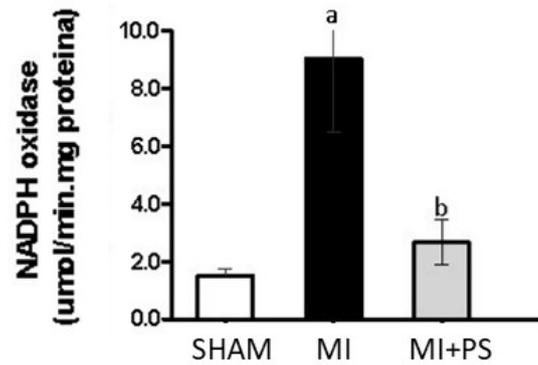


Figura 21. Atividade da NADPH oxidase na artéria aorta de animais submetidos ao infarto do miocárdio que receberam injeção de pterostilbeno ou ciclodextrina durante 8 dias.

Dados expressos: média  $\pm$  desvio padrão. Teste de Tukey foi realizado para detectar diferenças entre os grupos. <sup>a</sup> representa diferença em relação ao grupo SHAM  $p < 0,05$ . <sup>b</sup> representa diferença em relação ao grupo MI  $p < 0,05$ .

A atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS), no tecido da artéria aorta, não apresentaram diferenças entre os grupos (SHAM, MI e MI+PS) (Figura22).

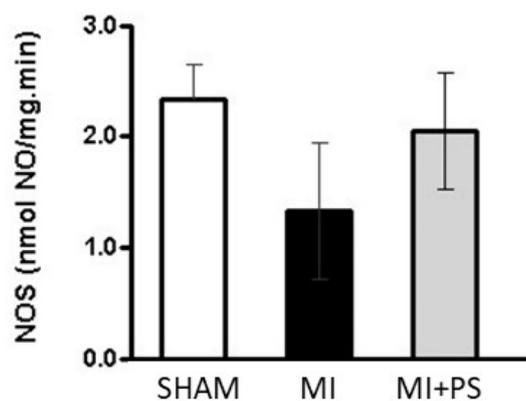


Figura 22. Atividade da óxido nítrico sintase (NOS) na artéria aorta de animais submetidos ao infarto do miocárdio que receberam injeção de pterostilbeno ou ciclodextrina durante 8 dias.

Dados expressos: média  $\pm$  desvio padrão. Teste de Tukey foi realizado para detectar diferenças entre os grupos.

Com relação à concentração de sulfidrilas no tecido aórtico, tivemos diferença somente no grupo tratado com pterostilbeno (MI+PS) em relação ao grupo controle SHAM ( $p < 0,05$ ; dados estatísticos  $p = 0,0492$   $F = 3,991$  e  $R$  quadrado  $= 0,4339$ ) (Figura 23).

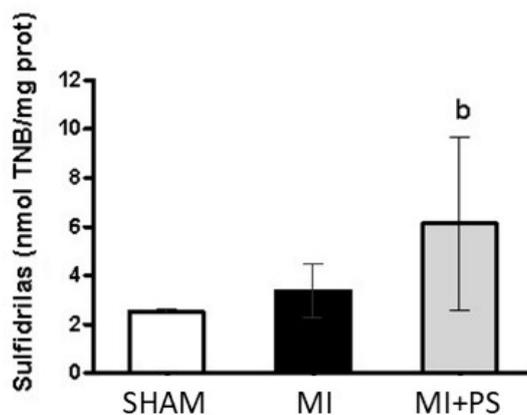


Figura 23. Grupos sulfidrilas na artéria aorta de animais submetidos ao infarto do miocárdio que receberam injeção de pterostilbeno ou ciclodextrina durante 8 dias.

Dados expressos: média  $\pm$  desvio padrão. Teste de Tukey foi realizado para detectar diferenças entre os grupos. <sup>b</sup> representa diferença em relação ao grupo MI  $p < 0,05$ .

A imunodeteção da proteína xantina oxidase na aorta foi realizada nos grupos por western blot. O grupo infartado e tratado com pterostilbeno teve um decréscimo na expressão da xantina oxidase em relação ao grupo infartado – MI ( $p < 0,05$ ) (Figura 24).

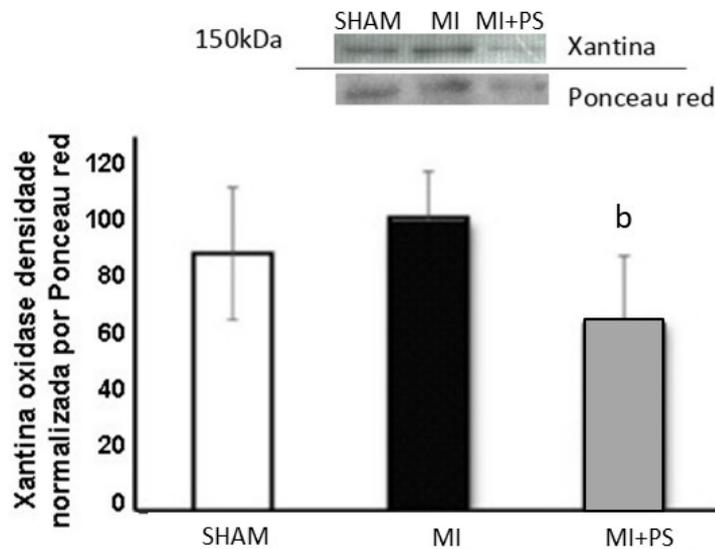


Figura 24. Imunoconteúdo da proteína xantina oxidase na artéria aorta de animais submetidos ao infarto do miocárdio que receberam injeção de pterostilbeno ou ciclodextrina durante 8 dias. As densidades foram mensuradas por Western blot e normalizadas pela densidade do Ponceau red. <sup>b</sup> representa diferença em relação ao grupo MI  $p < 0,05$ .

#### 9.6 Fígado: implicações sobre parâmetros do estresse oxidativo e impacto do tratamento com pterostilbeno

Dosamos as espécies reativas de oxigênio totais no fígado e não encontramos diferenças entre os grupos (SHAM, MI e MI+PS) (Figura 25).

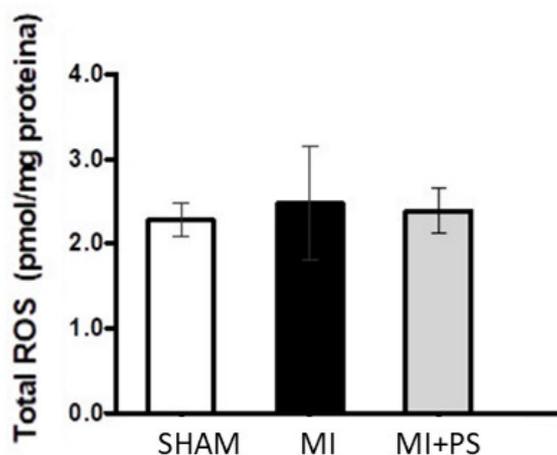


Figura 25. Concentração de espécies reativas de oxigênio totais no fígado de animais submetidos ao infarto do miocárdio que receberam injeção de pterostilbeno ou ciclodextrina durante 8 dias.

Dados expressos: média  $\pm$  desvio padrão. Teste de Tukey foi realizado para detectar diferenças entre os grupos.

Não houve diferenças significativas entre os grupos (SHAM, MI e MI+PS), das concentrações de grupos sulfidrilas no tecido hepático (Figura 26).

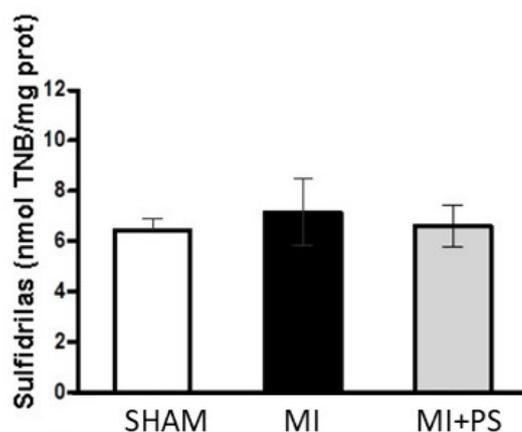


Figura 26. Grupos sulfidrilas no fígado de animais submetidos ao infarto do miocárdio que receberam injeção de pterostilbeno ou ciclodextrina durante 8 dias.

Dados expressos: média  $\pm$  desvio padrão. Teste de Tukey foi realizado para detectar diferenças entre os grupos.

Dosamos também a enzima glutationa-S-transferase no tecido hepático. E também não verificamos diferenças entre os grupos (SHAM, MI e MI+PS) (Figura 27).

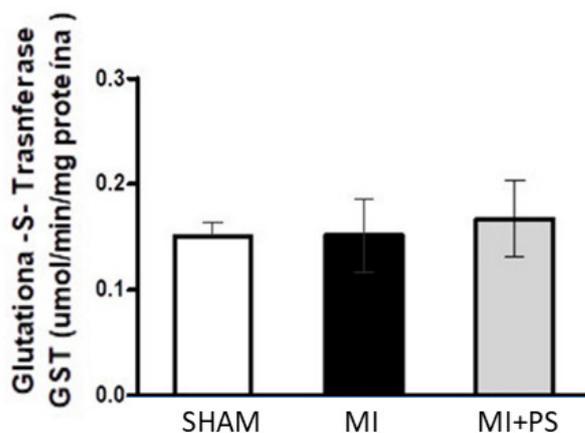


Figura 27. Atividade da glutathione-S-transferase no fígado de animais submetidos ao infarto do miocárdio que receberam injeção de pterostilbeno ou ciclodextrina durante 8 dias.

Dados expressos: média  $\pm$  desvio padrão. Teste de Tukey foi realizado para detectar diferenças entre os grupos.

Com relação à peroxidação lipídica no fígado não encontramos diferenças entre os grupos (SHAM, MI e MI+PS) (Figura 28).

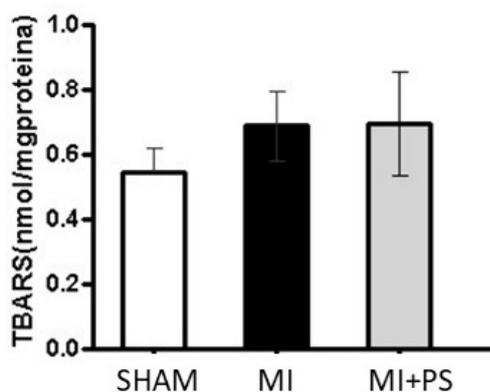


Figura 28. Peroxidação lipídica no fígado de animais submetidos ao infarto do miocárdio que receberam injeção de pterostilbeno ou ciclodextrina durante 8 dias.

Dados expressos: média  $\pm$  desvio padrão. Teste de Tukey foi realizado para detectar diferenças entre os grupos.

## 10. Discussão

Os dados da literatura que associam o impacto do infarto do miocárdio com disfunção pulmonar e dano no ventrículo direito ou dano hepatocelular ainda são escassos. A vasculatura pulmonar pode sofrer uma forte influência do remodelamento bioquímico e estrutural induzido pelo infarto, levando ao estabelecimento de alterações circulatórias, como hipertensão arterial pulmonar secundária<sup>64</sup>. Por outro lado, a lesão da circulação pulmonar leva a consequências adversas no ventrículo direito, com o aumento da pós-carga da câmara<sup>65</sup>. Consequentemente, o infarto provoca alterações hemodinâmicas no ventrículo direito, levando a um remodelamento não adaptativo. Nesse contexto, o estresse oxidativo desempenha um papel crítico como mediador de danos celulares no pulmão e no próprio ventrículo direito. Assim, o aumento na resposta antioxidante pode ser uma estratégia para evitar esse dano.

Avaliando a morfologia e função do ventrículo esquerdo após o infarto, ambos os grupos infartados mostraram dilatação cardíaca, como demonstrado pelo aumento dos volumes cardíacos e comprometimento da contratilidade, pela diminuição da fração de encurtamento. A administração de pterostilbeno, no entanto, promoveu um aumento menor no volume sistólico final, uma vez que esse parâmetro foi diferente entre os grupos MI+PS e MI. Luz de Castro e colaboradores<sup>54</sup> encontraram em seu estudo uma melhora no parâmetro do volume sistólico final, indicando uma redução do volume residual ventricular pela administração dos hormônios da tireóide T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub>. Devido esse fato, os animais apresentaram melhores condições hemodinâmicas apesar do infarto do miocárdio. Em nosso estudo, consideramos esse resultado positivo, pois o aumento do volume sistólico final pode estar relacionado ao desenvolvimento de congestão pulmonar. De fato, nos animais do grupo MI+PS, o pterostilbeno impediu a congestão pulmonar.

O perímetro infartado não foi diferente entre os grupos MI e MI+PS, demonstrando homogeneidade da lesão cardíaca entre esses grupos. Quantos os parâmetros morfométricos, nem o ventrículo direito e nem o ventrículo esquerdo apresentaram hipertrofia. Esses resultados podem estar relacionados

ao fato de que os animais foram avaliados apenas 14 dias após o infarto. Nesse período, um estudo anterior do nosso grupo de trabalho, também não encontrou nenhuma diferença nestes parâmetros<sup>66</sup>.

O pulmão é o órgão mais afetado pela insuficiência cardíaca e a disfunção pulmonar é um fator chave para mau resultado clínico em pacientes infartados<sup>67</sup>. Hichka e colaboradores demonstraram que há uma intensificação do estresse oxidativo no tecido pulmonar após infarto do miocárdio<sup>68</sup>. No entanto, no nosso estudo os níveis totais de espécies reativas de oxigênio no grupo infartado não sofreram alterações. Todavia, no nosso estudo o grupo MI mostrou um aumento da peroxidação lipídica, indicando dano oxidativo no pulmão. Por outro lado, os pulmões do grupo MI+PS mostraram aumento nos níveis de ROS totais. Tremi e colaboradores demonstraram o papel dos estilbenos para induzir a produção de EROs in vitro<sup>69</sup>, corroborando com os dados do presente estudo. No entanto diferentemente dos animais infartados, o grupo MI+PS mostrou uma redução na peroxidação lipídica onde foi observado um decréscimo nos níveis de TBARS nesses animais. Em vista disso, uma hipótese possível é que esse aumento nos níveis de ROS totais causada pela administração do pterostilbeno pode representar uma condição de hormese<sup>70</sup>, que leva a um aumento nas defesas antioxidantes, induzido pela elevação prévia das espécies reativas, prevenindo a peroxidação lipídica. De fato, em estudos anteriores com outros compostos que apresentam efeitos pró-oxidantes, como o sulforafano, já descreveram esse mecanismo protetor de estimulação do sistema antioxidante<sup>71</sup>.

O tratamento com pterostilbeno pode provocar uma adaptação contra níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio através de alterações oxidativas celulares na SOD e na CAT, que são duas enzimas importantes que pertencem à primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo<sup>9</sup>. Em nosso estudo, redução da atividade da SOD no pulmão do grupo infartado MI sugere uma proteção deficiente contra o radical ânion superóxido, o que poderia causar um aumento no estresse oxidativo nos estágios posteriores do infarto do miocárdio<sup>72</sup>. Por outro lado, o tratamento com pterostilbeno recuperou a atividade da SOD no grupo MI+PS, demonstrando seu efeito protetor na homeostase redox. Como consequência da reação da dismutação, o peróxido

de hidrogênio pode ser metabolizado pela catalase, que apresenta uma constante de Michaelis-Menten elevada, permitindo uma atividade desintoxicante em altos níveis de peróxido de hidrogênio<sup>9,73</sup>. Em relação a isso, nossos resultados mostraram um aumento da atividade da CAT no tecido pulmonar do grupo MI+PS. O peróxido de hidrogênio pode reagir com metais, como o ferro, e produzir radicais hidroxila<sup>74</sup>, esse aumento da catalase no grupo MI+PS surge como uma importante defesa contra a geração desse radical nos pulmões. Como o tecido respiratório é intensamente perfundido devido à sua função de hematose, o ferro presente nas células sanguíneas pode ser um substrato potente para a geração de radicais livres. Portanto, os resultados da SOD e CAT indicam que o pterostilbeno pode ser uma estratégia promissora para reduzir o estresse oxidativo nos pulmões após o infarto e também reforça a hipótese de um efeito hormético deste composto nesse órgão.

Em termos de defesas antioxidantes não enzimáticas, verificou-se um aumento da concentração da glutathiona reduzida (GSH) nos pulmões do grupo MI+PS. A GSH possui baixo peso molecular<sup>75</sup>, e está envolvida em reações de desintoxicação de substâncias orgânicas e inorgânicas como peróxidos<sup>76</sup>. O GSH atua como doador de elétrons<sup>77</sup> e participa da regulação redox da homeostase<sup>78</sup> contribuindo para a sobrevivência celular. No presente estudo, um aumento da concentração da GSH provavelmente também contribuiu para a redução dos níveis de TBARS no grupo MI+PS, diminuindo o estresse oxidativo desses animais. Além da estimulação enzimática e não enzimática das defesas, o tratamento com pterostilbeno também poderia induzir melhora no perfil antioxidante de proteínas citoprotetoras no tecido pulmonar<sup>79</sup>.

Nesse contexto, a proteína Nrf2 é uma proteína citoprotetora que atua como um fator de transcrição e esta é sensível às alterações redox, desempenhando um papel fundamental na resposta antioxidante pulmonar<sup>71</sup>. Em situações de estresse, o Nrf2 é ancorada a duas proteínas Keap1 (do inglês – Kelch-like ECH-associated Protein 1) (Figura 9). Contudo, quando há interrupção da homeostase redox, o complexo Nrf2-Keap1 se dissocia e libera Nrf2, que pode translocar-se para o núcleo e iniciar a expressão de moléculas antioxidantes<sup>21,</sup>

De fato, estudos na literatura demonstraram que a Nrf2 desempenha um papel importante na síntese de enzimas antioxidantes endógenas<sup>81</sup>. Além disso, de acordo com Lacerda e colaboradores<sup>26</sup>, o pterostilbeno regula positivamente a expressão de Nrf2, que aumenta a glutatona reduzida (GSH) e atenua os danos oxidativos. Em nosso estudo, os níveis do imunocontéudo de Nrf2 aumentaram nos pulmões dos animais do grupo MI+PS, sugerindo que o pterostilbeno induz a ativação do Nrf2, o que poderia ser uma explicação para a melhora nas defesas antioxidantes e na redução da peroxidação lipídica. Em vista desses dados, o pterostilbeno mostrou ser protetor aos pulmões após o infarto, uma vez que esse composto impediu a congestão do órgão, aumentou as atividades da SOD e CAT, aumentou a GSH e preveniu a peroxidação lipídica, bem como induziu a expressão da Nrf2, que é uma proteína citoprotetora.

Em relação ao ventrículo direito, o cenário pró-oxidativo do infarto do miocárdio se manifesta significativamente nesta câmara<sup>47</sup>. Nossos resultados mostraram que o infarto leva ao aumento da expressão da xantina oxidase no ventrículo direito. Wang e colaboradores também mostraram níveis aumentados de xantina oxidase em seus experimentos 12 semanas após o infarto, associado à peroxidação lipídica e à disfunção cardíaca. Além disso, o tratamento com alopurinol, um inibidor clássico da atividade da xantina oxidase, atenua o desbalanço redox provocado pela insuficiência cardíaca pós-infarto do miocárdio<sup>82</sup>. Outro estudo avaliando pacientes com insuficiência cardíaca apresentou aumento da atividade da xantina oxidase quando comparados com grupo controle<sup>83</sup>. Outra enzima pró-oxidante importante na condição do infarto e fonte de EROs é a NADPH oxidase, a qual também foi objetivo deste estudo. Sua atividade estava aumentada no ventrículo direito do grupo MI. Corroborando com nossos dados, o trabalho de Looi e colaboradores<sup>84</sup> demonstrou um aumento da produção do ânion superóxido em homogeneizados de miocárdio pós-infarto, que foi mitigado pelo uso de um inibidor de NADPH oxidase. Além disso, um modelo de camundongos knockout para a subunidade NADPH oxidase gp 91<sup>phox</sup> revelou melhora dos parâmetros ecocardiográficos<sup>84</sup>.

Os níveis elevados de atividade da xantina oxidase e da NADPH oxidase predispõe o ventrículo direito ao aumento da concentração do ânion superóxido, e conseqüentemente depleção de reserva antioxidante. Corroborando com esses resultados, também encontramos níveis reduzidos de sulfidrila no grupo MI. Em relação a isso, Sulakhe e colaboradores<sup>85</sup> demonstraram que cardiomiócitos isolados de ratos adultos, que foram incubados em um sistema com geração de radical hidroxila ou expostos a agentes oxidantes de sulfidrila, apresentaram troponina I diminuída e reduzida fosforilação de fosfolambano induzida por isoproterenol<sup>85</sup>. Esse mesmo grupo de pesquisa também mostrou que a oxidação dos grupos tiol da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA) em cardiomiócitos diminui a captação de cálcio<sup>86</sup>.

Na aorta avaliamos o impacto do infarto experimental nesse tecido e as implicações do tratamento com pterostilbeno. Analisando os dados obtidos da aorta, verificamos que as concentrações de espécies reativas do oxigênio totais não variaram entre os grupos. Porém, verificamos aumento significativo da atividade da NADPH oxidase no tecido aórtico no grupo MI. Com o tratamento com pterostilbeno houve uma diminuição significativa com relação ao grupo MI. O ânion superóxido gerado pela NADPH oxidase pode reagir com outros compostos químicos circulantes na célula e formar peroxinitritos ( $\text{OONO}^-$ ), formado pela reação entre o ânion superóxido com o óxido nítrico<sup>88</sup>. Em estudos relacionados à hipertensão arterial sistêmica, dentre as enzimas mais atuantes no estresse oxidativo, a maior fonte de ERO é a NADPH oxidase, a qual é ativada pela angiotensina II, atuando nos receptores AT-1, gerando contração no vaso<sup>89</sup>. A expectativa era que essa atividade da NADPH oxidase estivesse relacionada a um maior estresse oxidativo do tecido e uma menor ação do óxido nítrico neste local, ocasionando vasoconstrição. As NADPH oxidases não foram identificadas apenas como contribuintes importantes e desencadeadoras de doenças cardiovasculares, mas também confere funções importantes na homeostase vascular<sup>90</sup>. Nesse sentido, dosamos a atividade da enzima óxido nítrico sintase no tecido aórtico. Não encontramos diferença significativa entre os grupos. Neste caso, a hipótese de alterações da produção

de óxido nítrico decorrente do infarto ou do infarto+ tratamento pelas alterações da atividade da enzima óxido nítrico sintase não foi confirmada.

Ainda, no homogeneizado da artéria aorta, dosamos os grupos sulfidril, importante mecanismo antioxidante não enzimático. Encontramos, neste parâmetro, um aumento das concentrações no grupo infartado tratado com pterostilbeno (Figura 23). O sistema de defesa antioxidante não enzimático consiste numa variedade de substância, que podem ser endógenas, como as glutations, ou dietéticas, como vitaminas (C e E), minerais (zinco, cobre, selênio e magnésio) e compostos fenólicos<sup>16</sup>.

Detaca-se como antioxidante não enzimático a glutatona reduzida (L-glutamil-L-cisteinil-glicina). Esse tripeptídeo é considerado um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante intracelular e também possui um papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos<sup>16</sup>. A capacidade redutora da GSH é determinada basicamente pelo seu grupamento sulfidril, presente no aminoácido cisteína<sup>97</sup>. Esse grupamento é altamente polarizável, tornando-o um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos. Esta habilidade de doar elétrons a outros compostos faz da glutatona um bom redutor. Portanto, o grupamento sulfidril é susceptível a reações com ERO e ERN, levando à geração de modificações oxidativas pós-translacionais, as quais podem alterar a função proteica<sup>98</sup>.

Foi determinado o imunoconteúdo da proteína xantina oxidase. A xantina oxidase é conhecida pelo seu papel catalítico na degradação de purinas metabolizando hipoxantina em xantina e xantina a ácido úrico, concomitantemente à formação do ânion superóxido<sup>91</sup>. Nos mamíferos os mais altos índices de atividade são encontrados no fígado e no intestino delgado, mas também são encontrados em outros tecidos como o coração e a vasculatura<sup>91</sup>. Verificamos uma diminuição significativa do imunoconteúdo da xantina oxidase do grupo MI+PS, sugerindo uma diminuição da formação do ânion superóxido através desta proteína neste grupo tratado com pterostilbeno, melhorando estresse oxidativo com relação esse ERO. Encontramos na literatura que a xantina oxidase também possui propriedades nitrito-redutases sendo capaz de converter nitrito a óxido nítrico (NO), e desta forma, contribuem

para os efeitos benéficos do NO na vasculatura, e em essência, a reação de redução do nitrito em NO mediada pela xantina oxidase é reversa à oxidação da xantina à ácido úrico, sendo NADH como substrato para redução<sup>92</sup>. Essa produção de óxido nítrico é alternativa e independe da atividade da enzima óxido nítrico sintase.

Avaliamos também o impacto do infarto do miocárdio experimental e o tratamento com pterostilbeno no tecido hepático, já que após infarto podemos ter disfunções circulatórias levando progressivamente a insuficiência cardíaca do coração, mas esta não ocorrendo de forma isolada havendo envolvimento do fígado<sup>4</sup>. O fígado é destino de 25% do débito cardíaco, e aproximadamente 25% do fluxo sanguíneo hepático é arterial, o restante é sangue desoxigenado que circula pelo sistema porta. A veia porta não possui capacidade de autorregulação de fluxo, porém a artéria hepática é capaz de comportar até 60% de redução do fluxo portal, mas o fígado é susceptível a lesão<sup>4</sup>. Com relação ao estresse oxidativo, em nosso estudo, não encontramos diferenças entre os grupos para as concentrações de espécies reativas de oxigênio totais. Queríamos saber se as reservas de antioxidantes não enzimáticas haviam sido depletadas; então, foram avaliados grupos sulfidrilas no fígado e não encontramos diferenças significativas entre os grupos. Avaliamos a atividade da enzima glutationa-S-transferase (GST) que juntamente com as N-acetiltransferases e as enzimas da família do Citocromo P-450 (CYP) são responsáveis pela biotransformação de substância xenobióticas no fígado correspondendo a fase 1 deste processo de detoxificação<sup>93</sup>. Porém quando os produtos formados na fase 1 não sofrem inativação ou são ativados a substâncias mais reativas pelas enzimas da fase 2, estes intermediários reativos podem se ligar covalentemente ao DNA e causar diversas formas de dano ao organismo, pois agirão como agente mutagênico e ou carcinogênico<sup>93</sup>. A glutationa-S-transferase não apresentou diferenças significativas entre os grupos. A peroxidação lipídica mensurada através do teste TBARS também não apresentou diferenças significativas entre os grupos. Associando os resultados da GST e do TBARS podemos pressupor que tanto o infarto do miocárdio experimental como o tratamento com

pterostilbeno não alterou a funcionalidade do fígado em processar substâncias xenobióticas, neste caso o próprio pterostilbeno.

Infelizmente por não ter mais disponível soro destes animais a dosagem sérica ficou comprometida e não foi realizada (uma limitação do nosso estudo). A principal aplicação clínica da medição de AST e ALT é a detecção e o diagnóstico etiológico diferencial da doença hepática. A lesão das células hepáticas é manifestada pela atividade sérica elevada das transaminases antes do aparecimento de sintomas e sinais clínicos (como icterícia). Elevações comparáveis de AST e ALT são altamente características de hepatite viral, tóxica ou não-alcoólica aguda causada por drogas. Pensa-se que os níveis séricos semelhantes de transaminase nessas condições sejam causados pela liberação celular de apenas enzimas citoplasmáticas associadas a danos reversíveis às células hepáticas. Na hepatite crônica e cirrose, os níveis séricos de AST são maiores que a ALT; isso pode refletir necrose de células hepáticas com liberação de AST mitocondrial<sup>94</sup>. Após o infarto do miocárdio, a atividade da AST aumenta consistentemente; ALT está associado à congestão passiva do fígado. A atividade sérica de AST e apenas ocasionalmente ALT aumenta nas doenças inflamatórias do músculo esquelético e na distrofia muscular progressiva<sup>94</sup>. A causa mais comum de lesão hepática aguda decorrente de doença cardíaca é a isquemia hepática e hepatite hipóxica<sup>4</sup>. A maioria dos casos de hepatite isquêmica ocorre no contexto da insuficiência cardíaca gerando hipotensão arterial e congestão venosa passiva crônica<sup>4</sup>.

## 11. Conclusões

### Geral

Os resultados morfométricos e funcionais revelaram a interrelação entre o sistema cardíaco e pulmonar para se adaptar às alterações adversas impostas pelo infarto do miocárdio. Do ponto de vista bioquímico, o infarto do miocárdio, demonstrou causar alterações significativas principalmente nos coração e nos pulmões, as quais repercutiram sobre o tecido vascular e hepático, ainda que de forma discreta. Neste contexto, o estresse oxidativo esteve presente com mediador principal dos danos teciduais no infarto do miocárdio, haja vista que

uso de um antioxidante, como pterostilbeno, contribuiu para restabelecimento da homeostase redox nos tecidos estudados nesta dissertação.

### Específicas

O aumento das espécies reativas de oxigênio totais no tecido pulmonar do grupo MI+PS não fazia sentido isoladamente. Contudo, percebemos, ao analisar os resultados da peroxidação lipídica e da expressão da proteína Nrf2 no tecido pulmonar no grupo tratado com pterostilbeno, uma relação entre a redução do dano celular com aumento nas defesas antioxidantes por mecanismos horméticos descrito na literatura e observado em nosso estudo. O comportamento enzimático da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) no tecido pulmonar corroboram para a hipótese do efeito hormético já que a SOD estava diminuída no grupo infartado e recuperou-se no grupo tratado com pterostilbeno e a catalase aumentou no grupo tratado com pterostilbeno.

No ventrículo direito do grupo MI encontramos um aumento da expressão da xantina oxidase e um aumento da atividade da NADPH oxidase. Os níveis elevados de atividade da xantina oxidase e da NADPH oxidase predispõem o ventrículo direito ao aumento da concentração do ânion superóxido, e conseqüentemente depleção de reserva antioxidante. O pterostilbeno foi capaz de diminuir a atividade da NADPH oxidase no grupo MI+PS. Entretanto, o tratamento com pterostilbeno (MI+PS) apresentou um resultado intermediário, pois o imunoconteúdo da xantina oxidase foi similar não somente ao grupo SHAM, mas também ao grupo infartado.

A diminuição da atividade da óxido nítrico sintase no ventrículo direito do grupo MI, demonstrando que o infarto ocasiona uma diminuição da atividade desta enzima, gera uma menor disponibilidade de óxido nítrico neste local. O tratamento com pterostilbeno não foi eficaz na melhora deste parâmetro.

No presente estudo, o aumento da atividade da NADPH oxidase e xantina oxidase induzido pelo infarto do miocárdio na aorta aumenta o potencial do dano oxidativo neste tecido. Conseqüentemente isso pode implicar a remoção de NO nesse local, vasoconstrição e aumento do dano oxidativo. Porém o tratamento com pterostilbeno melhorou este cenário efetivamente, pois induziu

uma redução da atividade da NADPH oxidase, da expressão da xantina oxidase, indicando que essas enzimas são alvos potenciais do mecanismo de ação do pterostilbeno.

Já no fígado a ação do pterostilbeno demonstrou não interferir no processo de conjugação hepática, já que não houve alterações na enzima GST. Infelizmente por não avaliarmos as enzimas hepáticas séricas não podemos avaliar o comprometimento hepático decorrente do infarto. Sabe-se que o fígado apesar de sofrer injúrias devido às disfunções circulatórias possui ter a capacidade resiliente de suportar, por um período de tempo, agressões hemodinâmicas e de estresse oxidativo.

## 12. Perspectivas

O trabalho apresentado deixou algumas perguntas em relação às complicações decorrente do infarto. Uma observação maior talvez demonstrasse a ocorrência da insuficiência cardíaca e se de fato isso não levaria a danos mais pronunciados no tecido hepático, por exemplo.

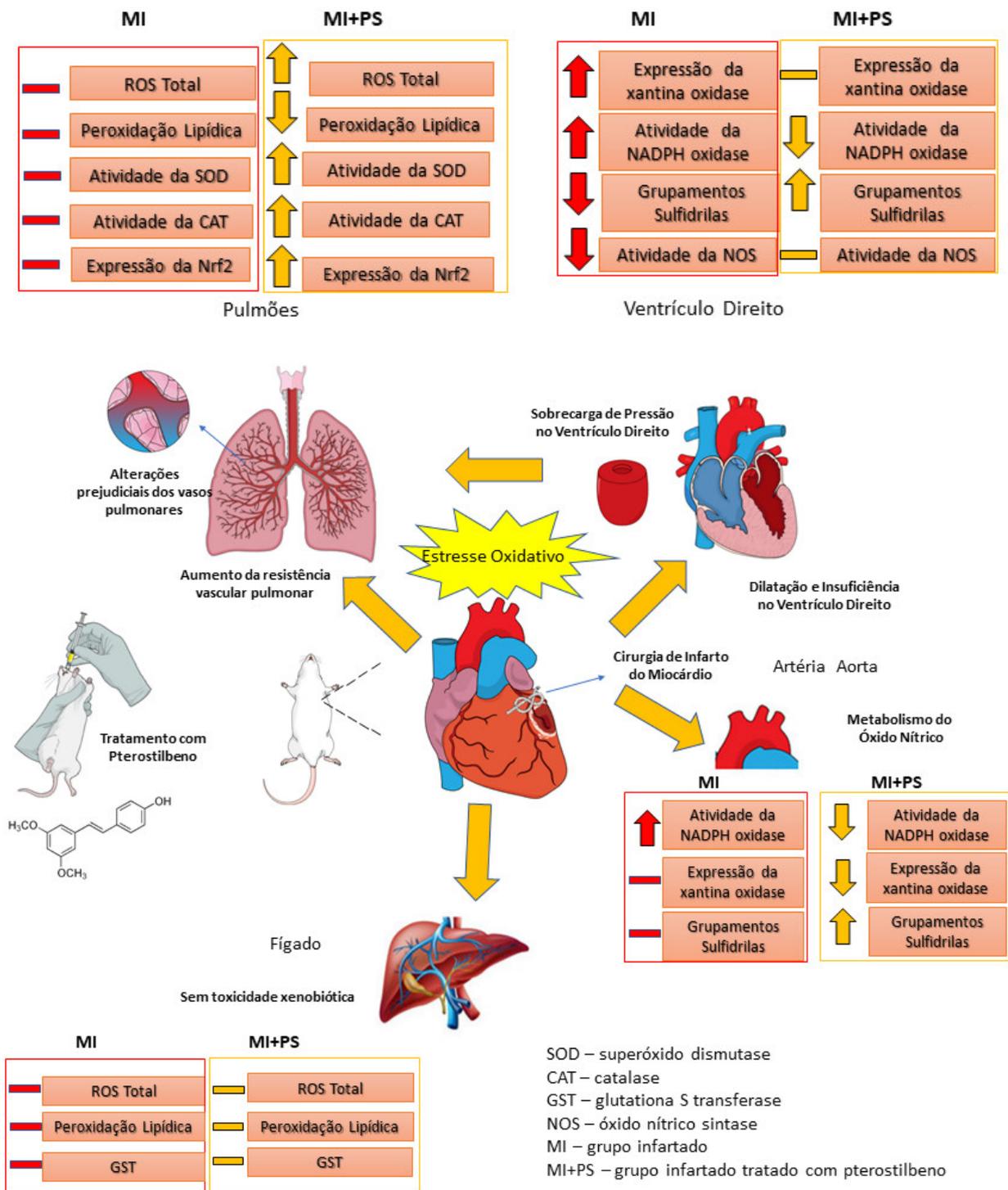
Os fitoquímicos naturais originários de alimentos estão sendo cada vez mais estudados para se avaliar possíveis potenciais terapêuticos utilizados como adjuvantes em tratamento de doenças, como exemplo doenças cardiovasculares.

O mirtilo, fruto que contem além do pterostilbeno uma ampla variedade de compostos como polifenóis e antocianinas. No futuro, o grande desafio é saber quais as quantidades destes fitoquímicos devem ser consumidos para terem benefícios a quem os consomem.

O pterostilbeno demonstrou no nosso trabalho e em diversos artigos publicados que possui enorme potencial, melhorando a homeostase redox dos animais testados. Porém estudos clínicos são necessários para comprovação destes benefícios em humanos.

Na Figura 29 temos uma representação gráfica das conclusões deste trabalho.

Figura 29. Representação gráfica das conclusões



Fonte: elaborado pelo autor.

### 13. Referências Bibliográficas

1. Organização Mundial da Saúde - OMS. Disponível em: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
2. Santos, Juliano dos *et al* . Mortalidade por infarto agudo do miocárdio no Brasil e suas regiões geográficas: análise do efeito da idade-período-coorte. *Ciênc. saúde coletiva*, Rio de Janeiro, v.23, n.5, p.1621-1634, May 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1413-81232018235.16092016>
3. Bax JJ, Di Carli M, Narula J, Delgado V. Multimodality imaging in ischaemic heart failure. *Lancet*. 2019;393:1056-1070
4. Ford R, Book W, Spivey JR, Liver disease related to the heart, *Transplantation Reviews* 29 (2015) 33-37
5. Gimbrone, M. A., Jr, & García-Cardena, G. (2013). Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovascular pathology: the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 22(1), 9–15.
6. Woodside JV, Young IS, Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001;54:176–186
7. Aydin S, Ugur K, Aydin S, Sahin I, Yardim M. Biomarkers in acute myocardial infarction: Current perspectives. *Vascular health and risk management*. 2019;15:1-10
8. Zemskov E, Lu Q, Wojciech Ornatowski W, Klinger CN, Desai AA, Maltepe E, Yuan JX, Wang T, Fineman JR, Black S. Biomechanical forces and oxidative stress: Implications for pulmonary vascular disease. *Antioxidants & redox signaling*. 2019
9. Halliwell B, Gutteridge JM. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med*. 1995;18:125-126

10. Comhair SA, Erzurum SC. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283:L246-255
11. Roy J, Galano JM, Durand T, Le Guennec JY, Lee JC. Physiological role of reactive oxygen species as promoters of natural defenses. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2017;31:3729-3745
12. Pinilla EM, Navarro G, Franco R. Hormetic and mitochondria-related mechanisms of antioxidant action of phytochemicals *Antioxidants* 2019, 8, 373; doi:10.3390/antiox8090373
13. Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International review of cell and molecular biology*, 298, 229–317. doi:10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7
14. Camaré, C., Pucelle, M., Nègre-Salvayre, A., & Salvayre, R. (2017). Angiogenesis in the atherosclerotic plaque. *Redox biology*, 12, 18–34. doi:10.1016/j.redox.2017.01.007
15. Vizcaino FP, Cogolludo A, Moreno L, Reactive oxygen species signaling in pulmonary vascular smooth muscle *Respiratory Physiology & Neurobiology* 174(3):212-220
16. Halliwell, BG, JM, Free radicals in biology medicine. New York: Oxford University Press, 2007.
17. Reinisalo, M., Kårlund, A., Koskela, A., Kaarniranta, K., & Karjalainen, R. O. (2015). Polyphenol Stilbenes: Molecular Mechanisms of Defence against Oxidative Stress and Aging-Related Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015, 340520. doi:10.1155/2015/340520
18. Tremel J, Lelakova V, Smejkal K, Paulickova T, Labuda S, Granica S, Havlik J, Jankovska D, Padrtova T, Hosek J. Antioxidant activity of selected stilbenoid derivatives in a cellular model system. *Biomolecules*. 2019;9
19. Hill MF, Singal PK. Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction. *Circulation*. 1997;96:2414-2420

20. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl AcadSci USA*. 1994;91(21):9926-30. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.91.21.9926>.
21. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev*. 1999;13(1):76-86. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.13.1.76>.
22. Niture SK, Khatri R, Jaiswal AK. Regulation of Nrf2-an update. *Free Radic Biol Med*. 2014;66:36-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.008>.
23. Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(9):1304-9.
24. Huang Y, Li W, Su ZY, Kong AN. The complexity of the Nrf2 pathway: beyond the antioxidant response. *J Nutr Biochem*. 2015;26(12):1401-13.
25. Sihvola V, Levonen AL. Keap1 as the redox sensor of the antioxidant response. *Arch Biochem Biophys*. 2017;617:94-100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2016.10.010>.
26. Lacerda D, Ortiz V, Turck P, Campos-Carraro C, Zimmer A, Teixeira R, Bianchi S, de Castro AL, Schenkel PC, Bello-Klein A, Bassani VL, da Rosa Araujo AS. Stilbenoid pterostilbene complexed with cyclodextrin preserves left ventricular function after myocardial infarction in rats: Possible involvement of thiol proteins and modulation of phosphorylated gsk-3beta. *Free radical research*. 2018;52:988-999
27. Lacerda D, Turck P, Gazzi de Lima-Seolin B, Colombo R, Duarte Ortiz V, Poletto Bonetto JH, Campos-Carraro C, Bianchi S, Belló-Klein A, Bassani VL, Rosa Araujo AS. Pterostilbene reduces oxidative stress, prevents hypertrophy and preserves systolic function of right ventricle in cor pulmonale model. *Br J Pharmacol*. 2017;174(19):3302–3314.

28. Zornoff, Leonardo A. M.; Paiva, Sergio A. R.; Minicucci, Marcos F. Spadaro, Joel. Infarto do miocárdio experimental em ratos: análise do modelo. *Arq. Bras. Cardiol.* [online]. 2009, vol.93, n.4 [cited 2019-11-25], pp.434-440. <http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2009001000018>.
29. Pacheco DM, Silveira VD, Thomaz A, Nunes RB, Elsner VR, Dal Lago P. Chronic heart failure modifies respiratory mechanics in rat: a randomized controlled trial. *Braz. J. Phys. Ther.* 2016 Jul-Aug;20(4):320-7. doi: 10.1590/bjpt-rbf.2014.0163.
30. Gabriel-Costa D. The pathophysiology of myocardial infarction-induced heart failure. Review. *Pathophysiology* 25 (2018) 277–284
31. Charalampopoulos, Athanasios et al. “Pathophysiology and Diagnosis of Pulmonary Hypertension Due to Left Heart Disease.” *Frontiers in medicine* vol. 5 174. 6 Jun. 2018, doi:10.3389/fmed.2018.00174
32. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(7):1957–1997. doi:10.1089/ars.2010.3586
33. Nagarajan N, Oka S, Sadoshima J. Modulation of signaling mechanisms in the heart by thioredoxin 1. *Free Radic Biol Med.* 2017;109:125–131. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.020
34. Lobo Filho, Heraldo Guedis et al. Modelo experimental de infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2011, vol.26, n.3 pp.469-476.
35. Chen H, Xu Y, Wang J, Zhao W, Ruan H. Baicalin ameliorates isoproterenol-induced acute myocardial infarction through iNOS, inflammation and oxidative stress in rat. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(9):10139–10147.
36. Goodman & GILMAN'S. The pharmacological basis of therapeutics. Laurence L. Brunton; John S. Lazo, Keith L. Parker. 11<sup>th</sup> ed. p.2021,2006.
37. Polo, Celi Macedo. Avaliação do efeito do óleo essencial de Citrus Aurantium L. no infarto do miocárdio em ratos. 2014. 80 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2014. Available at: <http://hdl.handle.net/11449/123842>.

38. de Castro AL, Tavares AV, Campos C, Fernandes RO, Siqueira R, Conzatti A, et al. Cardioprotective effects of thyroid hormones in a rat model of myocardial infarction are associated with oxidative stress reduction. *Molecular and cellular endocrinology* 2014;391(1-2):22-9.
39. Schenkel PC, Tavares AM, Fernandes RO, Diniz GP, Bertagnolli M, da Rosa Araujo AS, et al. Redox-sensitive prosurvival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats. *Molecular and cellular biochemistry* 2010;341(1-2):1-8.
40. Nozawa E, Kanashiro RM, Murad N, Carvalho AC, Cravo SL, Campos O, et al. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. *Brazilian journal of medical and biological research*, 2006; 39(5):687-95.
41. Akinwumi BC, Raj P, Lee DI, et al. Disparate Effects of Stilbenoid Polyphenols on Hypertrophic Cardiomyocytes In Vitro vs. in the Spontaneously Hypertensive Heart Failure Rat. *Molecules*. 2017;22(2):204. Published 2017 Feb 1. doi:10.3390/molecules22020204
42. Akinwumi BC, Bordun KM, Anderson HD. Biological Activities of Stilbenoids. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3):792. Published 2018 Mar 9. doi:10.3390/ijms19030792
43. Kosuru R, Kandula V, Rai U, Prakash S, Xia Z, Singh S. Pterostilbene decreases cardiac oxidative stress and inflammation via activation of AMPK/Nrf2/HO-1 pathway in fructose-fed diabetic rats. *Cardiovasc Drugs Ther* 2018; 32: 147–163
44. Ullah O, Li Z, Ali I, et al. Pterostilbene alleviates hydrogen peroxide-induced oxidative stress via nuclear factor erythroid 2 like 2 pathway in mouse preimplantation embryos. *J Reprod Dev*. 2019;65(1):73–81. doi:10.1262/jrd.2018-089
45. Franco R, Navarro G, Martinez-Pinilla E. Hormetic and mitochondria-related mechanisms of antioxidant action of phytochemicals. Review. *Antioxidants* 2019, 8(9), 373; <https://doi.org/10.3390/antiox8090373>
46. Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori* 1985;71(3):241-9.
47. Corssac GB, de Castro AL, Tavares AV, Campos C, Fernandes RO, Ortiz VD, et al. Thyroid hormones effects on oxidative stress and cardiac

- remodeling in the right ventricle of infarcted rats. *Life Sci* 2016;146:109-16.
48. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 1992;5(2):227-31.
  49. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in enzymology* 1990;186:407-21.
  50. Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in enzymology* 1981;77:373-82.
  51. Wei Y, Sowers JR, Nistala R, Gong H, Uptergrove GM, Clark SE, et al. Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 2006;281(46):35137-46.
  52. Marklund SL. Superoxide dismutase isoenzymes in tissues and plasma from New Zealand black mice, nude mice and normal BALB/c mice. *Mutation research* 1985;148(1-2):129-34.
  53. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology* 1984;105:121-6.
  54. Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology* 1984;105:114-21.
  55. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968;25(1):192-205.
  56. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 1951;193(1):265-75.
  57. Valdez LB, Zaobornyj T, Boveris A. Functional activity of mitochondrial nitric oxide synthase. *Methods in enzymology* 2005;396:444-55.
  58. de Castro AL, Fernandes RO, Ortiz VD, Campos C, Bonetto JH, Fernandes TR, et al. Thyroid hormones improve cardiac function and decrease expression of pro-apoptotic proteins in the heart of rats 14 days after infarction. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2016;21(2):184-94.

59. Shah P, Cowger JA. Crit Care Clin 30(2014)391-412  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2014.03.001>
60. Kasper, P., Tacke, F., Steffen, H. *et al.* Hepatische Dysfunktion bei Patienten mit kardiogenem Schock. *Med Klin Intensivmed Notfmed* 114, 665–676 (2019) doi:10.1007/s00063-019-00618-6
61. Ford RM, Book W, Spivey JR. Transplantation Reviews, Volume 29, Issue 1, January 2015, Pages 33-3
62. AST/GOT Liquiform. Instruções de uso. Disponível em:  
[https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/09/AST\\_GOT\\_Liquiform\\_POP.doc](https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/09/AST_GOT_Liquiform_POP.doc).
63. ALT/GPT Liquiform. Instruções de uso. Disponível [https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/09/ALT\\_GPT\\_Liquiform\\_POP.doc](https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/09/ALT_GPT_Liquiform_POP.doc)
64. Jankowich M, Choudhary G. Endothelin-1 levels and cardiovascular events. Trends in cardiovascular medicine 2019.
65. Greyson CR, Schwartz GG, Lu L, Ye S, Helmke S, Xu Y, et al. Calpain inhibition attenuates right ventricular contractile dysfunction after acute pressure overload. Journal of molecular and cellular cardiology 2008;44(1):59-68.
66. de Castro AL, Fernandes RO, Ortiz VD, Campos C, Bonetto JH, Fernandes TR, et al. Thyroid hormones improve cardiac function and decrease expression of pro-apoptotic proteins in the heart of rats 14 days after infarction. Apoptosis: an international journal on programmed cell death 2016; 21(2):184-94.
67. Yuan G, Han A, Wu J, Lu Y, Zhang D, Sun Y, et al. Bao Yuan decoction and Tao Hong Si Wu decoction improve lung structural remodeling in a rat model of myocardial infarction: Possible involvement of suppression of inflammation and fibrosis and regulation of the TGF-beta1/Smad3 and NF-kappaB pathways. Bioscience trends 2018;12(5):491-501.
68. Hichka SH. Malonic dialdehyde level in the blood and lungs in complicated course of acute myocardial infarction. Likars'ka sprava 2003(3-4):31-4.

69. Trembl J, Lelakova V, Smejkal K, Paulickova T, Labuda S, Granica S, et al. Antioxidant Activity of Selected Stilbenoid Derivatives in a Cellular Model System. *Biomolecules* 2019;9(9).
70. Mattson MP. Hormesis defined. *Ageing research reviews* 2008;7(1):1-7.
71. Fernandes RO, De Castro AL, Bonetto JH, Ortiz VD, Muller DD, Campos-Carraro C, et al. Sulforaphane effects on postinfarction cardiac remodeling in rats: modulation of redox-sensitive pro-survival and pro-apoptotic proteins. *The Journal of nutritional biochemistry* 2016;34:106-17.
72. Schenkel PC, Tavares AM, Fernandes RO, Diniz GP, Ludke AR, Ribeiro MF, et al. Time course of hydrogen peroxide-thioredoxin balance and its influence on the intracellular signalling in myocardial infarction. *Experimental physiology* 2012;97(6):741-9.
73. Roos D, Weening RS, Wyss SR, Aebi HE. Protection of human neutrophils by endogenous catalase: studies with cells from catalase-deficient individuals. *The Journal of clinical investigation* 1980;65(6):1515-22.
74. Lee JC, Son YO, Choi KC, Jang YS. Hydrogen peroxide induces apoptosis of BJAB cells due to formation of hydroxyl radicals via intracellular iron-mediated Fenton chemistry in glucose oxidase-mediated oxidative stress. *Molecules and cells* 2006;22(1):21-9.
75. Dincer Y, Alademir Z, Ilkova H, Akcay T. Susceptibility of glutathione and glutathione-related antioxidant activity to hydrogen peroxide in patients with type 2 diabetes: effect of glycemic control. *Clinical biochemistry* 2002;35(4):297-301.
76. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2005;45:51-88.
77. Toppo S, Flohe L, Ursini F, Vanin S, Maiorino M. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochimica et biophysica acta* 2009;1790(11):1486-500.
78. Mielal JJ, Gallogly MM, Qanungo S, Sabens EA, Shelton MD. Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxidants & redox signaling* 2008;10(11):1941-88.

79. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & redox signaling* 2008;10(8):1343-74.
80. Wang Y, Hai B, Ai L, Cao Y, Li R, Li H, et al. Tempol relieves lung injury in a rat model of chronic intermittent hypoxia via suppression of inflammation and oxidative stress. *Iranian journal of basic medical sciences* 2018; 21(12):1238-44.
81. Campos C, de Castro AL, Tavares AM, Fernandes RO, Ortiz VD, Barboza TE, et al. Effect of Free and Nanoencapsulated Copaiba Oil on Monocrotaline-induced Pulmonary Arterial Hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2017;69(2):79-85
82. Wang Z, Ding J, Luo X, Zhang S, Yang G, Zhu Q, et al. Effect of Allopurinol on Myocardial Energy Metabolism in Chronic Heart Failure Rats After Myocardial Infarct. *International heart journal* 2016;57(6):753-9.
83. Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, et al. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 2002;106(24):3073-8.
84. Looi YH, Grieve DJ, Siva A, Walker SJ, Anilkumar N, Cave AC, et al. Involvement of Nox2 NADPH oxidase in adverse cardiac remodeling after myocardial infarction. *Hypertension* 2008;51(2):319-25.
85. Sulakhe PV, Vo XT, Phan TD, Morris TE. Phosphorylation of inhibitory subunit of troponin and phospholamban in rat cardiomyocytes: modulation by exposure of cardiomyocytes to hydroxyl radicals and sulfhydryl group reagents. *Molecular and cellular biochemistry* 1997;175(1-2):98-107.
86. Morris TE, Sulakhe PV. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-pump dysfunction in rat cardiomyocytes briefly exposed to hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med* 1997;22(1-2):37-47.
87. Hernanz, R., A.M.Briones, et al (2014). "New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase in hypertension." *Clin Sci (Lond)* 126(2): 111-121.
88. Zimmet, JM and JM Hare (2006). Nitroso-redox interactions in the cardiovascular system. *Circulation* 114(14): 1531-1544.

89. Matsuno, K, H.Yamada, et al. (2005). Nox is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. *Circulation* 112 (17):2677-2685.
90. Takac, I., Schröder, K. & Brandes, R.P. *Curr Hypertens Rep* (2012) 14: 70. <https://doi.org/10.1007/s11906-011-0238-3>
91. de Jong, JWP van der Meer. et al. (1990). Xanthine oxidoreductase activity in perfused hearts of various species, including humans. *Circ Res* 67(3): 770-773
92. Khambata RS, Ghosh SM, et al. "Repurposing" of Xanthine Oxidoreductase as a Nitrite Reductase: A New Paradigm for Therapeutic Targeting in Hypertension. *Antioxid Redox Signal* 23(4): 340-353.
93. NAKAGIMA, T et al. Expression and polymorphism of Glutathione S-transferase in human lungs: risk factors in smoking-related lung cancer. *Carcinogenesis*, v.16, p.707-711, 1995.
94. Vroon DH, Israili Z. Aminotransferases. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 99. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK425/>
95. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. 1974 Nov 25; 249(22): 7130–7139.
96. Lubos E, Handy DE, Loscalzo J. Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis. *Front Biosci*. 2008;13:5323–5344. doi:10.2741/3084
97. Meister, A., Anderson, M.E. Glutathione. *Annu .Rev. Biochem.*, v. 52 p.711-760, 1983.
98. Rdyk, O.; Eaton, P. Redox Biology Biochemical methods for monitoring protein thiol redox states in biological systems. *Redox Biology*, v.2, p. 803-813, 2014.