

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

TESE DE DOUTORADO

**EFEITOS DO EXTRATO DE MIRTILO EM MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL  
PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA**

Autor: **Patrick Türck**

Orientador: **Dr. Alex Sander da Rosa Araujo**

Porto Alegre, novembro de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa De Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**Patrick Türck**

**EFEITOS DO EXTRATO DE MIRTILO EM MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL  
PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), como requisito para obtenção do grau de Doutor em Fisiologia.

Orientador: **Dr. Alex Sander da Rosa Araujo**

Porto Alegre, novembro de 2019

**Banca Examinadora**

**Prof. Dr. Paulo Cavalheiro Schenkel**

Universidade Federal de Pelotas  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

**Prof. Dr. Guilhian Leipnitz**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Departamento de Bioquímica

**Prof. Dra. Caroline Dani**

Centro Universitário Metodista IPA-RS

*“Todo o mundo tem o direito de ter suas próprias opiniões, mas não seus próprios fatos. Decadente é a sociedade que legitima a sabedoria das multidões no lugar do conhecimento adquirido por métodos científicos, nublando perigosamente os limites entre fato e opinião, entre argumentação embasada e bravata especulativa”.*

Trecho adaptado de *A Morte da Verdade*, **Michiko Kakutani**

*“O súdito ideal do governo totalitário não é o nazista convicto nem o comunista convicto, mas aquele para quem já não existe a diferença entre o fato e a ficção e a diferença entre o verdadeiro e o falso”*

Trecho adaptado de *Origens do Totalitarismo*, **Hannah Arendt**

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, **Cleonice**, por ser mãe e pai durante tantos anos, dedicando sua vida à minha criação e de minha irmã, por ser exemplo de perseverança, superação e amor.

À minha irmã, **Carolina**, pela amizade, carinho e inúmeras alegrias.

Ao meu amigo, **Bruno Carneiro**, pelos momentos de parceria e diversão.

Ao meu orientador, **Prof. Alex Sander da Rosa Araujo**, por ser exemplo por sua honra, ser inspiração por sua paixão pelo conhecimento e ter minha mais profunda admiração em sua conduta de humildade.

À **Profa. Adriane Belló-Klein**, pela dedicação em fazer crescer e tornar pessoas melhores aqueles que convivem em seu entorno.

À **Tânia Regina Gattelli Fernandes Piedras**, pelo auxílio, carinho, amizade, por cuidar de cada um de nosso laboratório como um membro da família.

À **Dra. Cristina Campos-Carraro**, pelos incontáveis ensinamentos e incentivos recebidos ao longo desses anos.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, pelo esforço e contribuição com esse trabalho, em especial à **Ma. Vanessa Ortiz e Dra. Denise Lacerda**.

Às alunas de Iniciação Científica **Schauana Fraga e Isadora Salvador**, pela confiança depositada em mim e por desenvolverem ótimos trabalhos.

À Profa. **Neelam Khaper**, pela recepção e orientação em seu laboratório na Northern Ontario School of Medicine, Universidade Lakehead, Canadá.

À banca examinadora, pela disposição e contribuição no aperfeiçoamento desse trabalho; em especial ao **Prof. Paulo Schenkel**, relator desta tese.

Aos docentes do **Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia** do **Depto. de Fisiologia**, pela excelência em seus trabalhos.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, por ser centro de referência em educação, extensão e pesquisa, resistindo frente aos ataques à educação pública do atual governo.

## RESUMO

**Introdução:** A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença caracterizada por disfunção endotelial progressiva e remodelamento vascular, levando ao aumento da resistência vascular pulmonar e à insuficiência do ventrículo direito (VD). Diversos elementos contribuem para a sua fisiopatologia, como o desequilíbrio entre vasodilatadores e vasoconstritores, maior ativação simpática e, como um dos elementos centrais, o estabelecimento do quadro de estresse oxidativo. Nesse contexto, o uso de antioxidantes naturais pode auxiliar a restaurar a homeostase redox e proteger os tecidos diretamente afetados na patologia, pulmões e VD. Assim, o mirtilo (*blueberry* - BB), um dos alimentos com maior capacidade antioxidante e tendo apresentado benefícios em outras condições patológicas, surge como uma alternativa de intervenção na HAP.

**Objetivos:** Esse trabalho teve como finalidade avaliar os efeitos do extrato de mirtilo sobre os pulmões e VD em um modelo *in vivo* de HAP induzida por monocrotalina, verificando sua atuação sobre parâmetros morfo-funcionais, bem como sua modulação do estado redox. Além disso, para avaliar o papel do extrato sobre possíveis vias envolvidas nas alterações do equilíbrio redox e na morte/sobrevivência de cardiomiócitos do VD, o desenvolvimento de um modelo *in vitro* de lesão de cardiomiócitos induzida por noradrenalina também foi alvo desse estudo.

**Material e Métodos:** Ratos Wistar machos ( $200 \pm 20$  gramas,  $n = 72$ ) foram divididos em oito grupos: Grupo Controle (CTR); Grupo Controle BB 50 mg/kg/dia (CTR BB50); Grupo Controle BB 100 mg/kg/dia (CTR BB100); Grupo Controle BB 200 mg/kg/dia (CTR BB200); Grupo Monocrotalina (MCT); Grupo Monocrotalina BB 50 mg/kg/dia (MCT BB50); Grupo Monocrotalina BB 100 mg/kg/dia (MCT BB100) e Grupo Monocrotalina BB 200 mg/kg/dia (MCT BB200). A HAP foi induzida por dose única de monocrotalina (60 mg / kg, intraperitoneal). Os animais receberam extrato de mirtilo oralmente, por gavagem, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg/dia. O tratamento com extrato de mirtilo durou 5 semanas (2 semanas anterior à indução por MCT e 3 semanas pós-indução). Ao 35º dia do protocolo experimental, os animais foram submetidos às análises morfométricas, ecocardiográficas e hemodinâmicas. Em seguida, os animais sofreram eutanásia, com coleta dos pulmões e coração para posteriores avaliações bioquímicas do equilíbrio redox. Cardiomiócitos (células H9c2) foram

cultivados em quatro condições: meio de cultura com ausência de noradrenalina (NE) e extrato de mirtilo (BBE): grupo Controle; meio na presença de 50 µg/ml de extrato de mirtilo: grupo BBE; meio na presença de 100 µM de noradrenalina: grupo NE; e meio na presença de 50 µg/ml de extrato de mirtilo e 100 µM de noradrenalina: grupo BBE+NE. Foram avaliadas a viabilidade celular, a ativação de caspases, o nível de estresse oxidativo e a expressão proteica de enzimas antioxidantes e proteínas sinalizadoras de vias redox e de morte/sobrevivência.

**Resultados:** O tratamento com extrato de mirtilo levou à melhora de parâmetros funcionais afetados pela HAP: aumentou a razão E/A pelo fluxo da tricúspide, a razão AT/ET pelo fluxo da artéria pulmonar, o TAPSE e o débito cardíaco do VD, ao passo que reduziu os diâmetros finais diastólico e sistólico do VD. A intervenção com o extrato também promoveu melhoras hemodinâmicas, evidenciadas pela atenuação dos valores das pressões sistólica do VD e média da artéria pulmonar, bem como reduziu a derivada pressão/tempo de contratilidade do VD. Essas alterações benéficas do extrato parecem ter sido consequência da retomada do equilíbrio redox. No tecido pulmonar, o tratamento diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), reduziu a atividade de NADPH oxidases e a expressão da enzima xantina oxidase, reduziu o dano oxidativo a lipídios, levou ao aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) e elevou o conteúdo de sulfidrilas. Além disso, o extrato retomou a expressão do fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2 (Nrf2) e diminuiu a razão da expressão proteica dos receptores de endotelina ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>. A intervenção com o mirtilo diminuiu a hipertrofia do VD, avaliada pelos índices de massa do VD/massa corporal, massa do VD/massa do ventrículo esquerdo e massa do VD/comprimento da tíbia. De forma semelhante à descrita para o tecido pulmonar, o extrato de mirtilo gerou retomada do equilíbrio redox no VD, ao ocasionar diminuição da atividade de NADPH oxidases, redução da lipoperoxidação e estimular maior atividade da enzima catalase. Os efeitos do extrato de mirtilo, quando avaliados sobre cardiomiócitos cultivados na presença de noradrenalina, incluem aumento da viabilidade celular e diminuição da atividade e expressão de caspases. Esses resultados foram associados à prevenção do quadro de estresse oxidativo induzido por noradrenalina, uma vez que verificamos diminuição da produção de EROs, da expressão da isoforma Nox2 das NADPH oxidases e do marcador de

oxidação de ácidos graxos 4-hidroxinonenal (4-HNE). Também observamos aumento das expressões das enzimas SOD, GPx e catalase quando do tratamento com o extrato. Em relação às vias de sinalização, a noradrenalina levou ao aumento da expressão da proteína quinase B (Akt), Forkhead box O3a (FoxO3a) e da proteína quinase alfa ativada por AMP (AMPK $\alpha$ ), bem como à diminuição da expressão proteica do transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3). O extrato atenuou o aumento da expressão de Akt, aumentou ainda mais a expressão FoxO3a e restaurou a expressão de STAT3. Além disso, extrato aumentou a expressão das proteínas mTOR e p70S6.

**Conclusão:** O presente estudo demonstrou que o tratamento com o extrato de mirtilo na HAP promove benefícios morfométricos, funcionais e hemodinâmicos cardiopulmonares. Particularmente, esses efeitos estão relacionados com a melhora do estado redox no tecido pulmonar e VD. O extrato de mirtilo ocasiona alterações positivas no equilíbrio redox através de sua atuação sobre diferentes vias de sinalização, que envolvem também a regulação de mecanismos de morte e sobrevivência celular de cardiomiócitos. Assim, o extrato de mirtilo surge como uma possível intervenção dietoterápica no tratamento da HAP.



## ABSTRACT

**Introduction:** Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a disease characterized by progressive endothelial dysfunction and vascular remodeling, leading to increased pulmonary vascular resistance and right ventricular (RV) insufficiency. Several elements contribute to its pathophysiology, such as the imbalance between vasodilators and vasoconstrictors, higher sympathetic activation and, as one of its central elements, the establishment of oxidative stress. In this context, the use of natural antioxidants can help restore redox homeostasis and protect the tissues directly affected by the pathology, lungs and RV. Thus, blueberry (BB), one of the foods with higher antioxidant capacity and having shown benefits in other pathological conditions, appears as an alternative intervention in PAH.

**Objectives:** The aim of this study was to evaluate the role of blueberry extract on the lungs and RV in an *in vivo* model of monocrotaline-induced PAH, verifying its effects on morphofunctional parameters, as well as its modulation of the redox state. Furthermore, we aimed to evaluate the role of the extract on possible pathways involved in redox balance changes and cardiomyocytes death/survival in the RV. For that, the development of an *in vitro* model of norepinephrine-induced cardiomyocyte injury was also subject of this study.

**Material and Methods:** Male Wistar rats ( $200 \pm 20$  grams,  $n = 72$ ) were divided into eight groups: Control Group (CTR); Control Group BB 50 mg/kg/day (CTR BB50); Control Group BB 100 mg/kg/day (CTR BB100); Control Group BB 200 mg/kg/day (CTR BB200); Monocrotaline Group (MCT); Monocrotaline BB Group 50 mg/kg/day (MCT BB50); Monocrotaline BB Group 100 mg/kg/day (MCT BB100) and Monocrotaline BB Group 200 mg/kg/day (MCT BB200). PAH was induced by a single dose of monocrotaline (60 mg/kg, intraperitoneal). The animals received blueberry extract orally by gavage at the doses of 50, 100 and 200 mg/kg/day. Blueberry treatment lasted 5 weeks (2 weeks prior to MCT induction and 3 weeks post-induction). On the 35th day of the experimental protocol, the animals were submitted to morphometric, echocardiographic and hemodynamic analyses. Then, the animals were euthanized, with lung and heart harvesting for further biochemical redox balance assessments. Cardiomyocytes (H9c2 cells) were incubated under four conditions: culture medium in the absence of norepinephrine (NE) and blueberry extract (BBE): Control group; culture medium in the presence of 50  $\mu$ g/ml blueberry extract: BBE group; culture

medium in the presence of 100  $\mu$ M noradrenaline: NE group; and culture medium in the presence of 50  $\mu$ g/ml blueberry extract and 100  $\mu$ M norepinephrine: BBE + NE group. Cell viability, caspases activation, oxidative stress level and protein expression of antioxidant enzymes and redox and death/survival signaling proteins were evaluated.

**Results:** Treatment with blueberry extract improved functional parameters affected by PAH: increased E/A ratio for tricuspid flow, AT/ET ratio for pulmonary artery flow, RV TAPSE, and RV cardiac output, while reduced the final diastolic and systolic diameters of the RV. Intervention with the extract also promoted hemodynamic improvements, evidenced by the attenuation of the RV systolic pressure and mean pulmonary artery pressure, as well as reduced the RV positive pressure/time derivative. These beneficial alterations of the extract seem to have been a consequence of the redox balance recovery. In lung tissue, treatment decreased the production of reactive oxygen species (ROS), reduced NADPH oxidase activity and xanthine oxidase expression, reduced oxidative damage to lipids, led to increased superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activities and increased sulfhydryl content. In addition, the extract increased nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) expression and decreased the protein expression ratio of ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> endothelin receptors. Blueberry intervention decreased RV hypertrophy, as assessed by RV mass/body mass, RV mass/left ventricle mass and RV mass / tibial length indices. Like that described for lung tissue, blueberry extract induced redox balance recovery in the RV, causing decreased NADPH oxidase activity, reduced lipoperoxidation and stimulated catalase enzyme activity. The effects of blueberry extract when evaluated on cardiomyocytes cultured in the presence of norepinephrine include increased cell viability and decreased activity and expression of caspases. These results were associated with the prevention of norepinephrine-induced oxidative stress, since we observed a decrease in ROS production, NADPH oxidase isoform Nox2 expression and 4-hydroxynonenal fatty acid oxidation marker. We also observed increased expression of SOD, GPx and catalase enzymes when cells were treated with the extract. Regarding signaling pathways, norepinephrine led to increased expression of Protein kinase B (Akt), Forkhead box O3a (FoxO3a) and AMP-activated protein kinase alpha (AMPK $\alpha$ ), as well as decreased protein expression of the Signal transducer and

activator of transcription 3 (STAT3). The extract attenuated the increase in Akt expression, further increased FoxO3a expression and restored STAT3 expression. In addition, blueberry extract increased expression of Mammalian target of rapamycin (mTOR) and p70S6 proteins.

**Conclusion:** The present study demonstrated that treatment with blueberry extract in PAH promotes cardiopulmonary morphometric, functional and hemodynamic benefits. Particularly, these effects are related to the improvement of redox state in lung tissue and RV. Blueberry extract causes positive changes in redox balance through its action on different signaling pathways, which also involve the regulation of cell death and survival mechanisms of cardiomyocytes. Thus, blueberry extract appears as a possible dietary intervention in the treatment of PAH.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1 Mirtilo</b> .....	<b>17</b>
1.1.1 Papel da <i>berries</i> na saúde .....	17
1.1.2 Caracterização do fruto .....	18
1.1.3 Mirtilo e doenças cardiovasculares .....	19
1.1.4 Mirtilo como antioxidante .....	20
<b>1.2 Hipertensão Arterial Pulmonar</b> .....	<b>22</b>
1.2.1 Definição e Diagnóstico .....	22
1.2.2 Epidemiologia .....	26
1.2.3 Patobiologia da HAP .....	29
1.2.4 Ativação simpática na HAP .....	28
1.2.5 Modelo animal para a HAP: Monocrotalina .....	31
1.2.6 Estresse oxidativo na HAP .....	33
<b>2. HIPÓTESE E OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
<b>2.1 Hipótese</b> .....	<b>36</b>
<b>2.2 Objetivo Geral</b> .....	<b>36</b>
<b>2.3 Objetivos Específicos</b> .....	<b>36</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1 Caracterização do extrato de mirtilo</b> .....	<b>38</b>
3.1.1 Extração de compostos fenólicos para análise .....	38
3.1.2 Quantificação de fenóis totais por Folin-Ciocalteu .....	38
3.1.3 Quantificação de flavonóides totais .....	38
3.1.4 Análise de compostos fenólicos por HPLC .....	39
3.1.5 Análise de antocianidinas por HPLC .....	39
<b>3.2 Estudos <i>in vivo</i></b> .....	<b>40</b>
3.2.1 Animais .....	40
3.2.2 Protocolos experimentais .....	40
3.2.3 Cálculo amostral .....	42
3.2.4 Ecocardiografia .....	42
3.2.5. Cateterismo .....	43
3.2.6 Análises morfométricas do ventrículo direito .....	44
3.2.7 Preparação dos tecidos para análises do equilíbrio redox .....	44
3.2.8 Análises do equilíbrio redox .....	44

3.2.8.1 Espécies reativas totais .....	44
3.2.8.2 Oxidação lipídica .....	44
3.2.8.3 Atividade de NADPH oxidase .....	45
3.2.8.4 Nitritos totais .....	45
3.2.8.5 Conteúdo de carbonilas .....	45
3.2.8.6 Atividade da enzima superóxido dismutase .....	45
3.2.8.7 Atividade da enzima catalase .....	46
3.2.8.8 Atividade da enzima glutathiona peroxidase .....	46
3.2.8.9 Conteúdo de sulfidrilas .....	46
3.2.9 Western blot .....	46
<b>3.3 Estudo <i>in vitro</i> .....</b>	<b>47</b>
3.3.1 Reagentes .....	47
3.3.2 Cultivo celular e tratamentos .....	48
3.3.3 Determinação da viabilidade celular .....	49
3.3.4 Análise de apoptose .....	49
3.3.5 Níveis de espécies reativas totais .....	49
3.3.6 Western blot .....	50
<b>3.4 Estatística .....</b>	<b>50</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1 CAPÍTULO I: artigo 1:</b> Extrato de mirtilo reduz o estresse oxidativo e melhora parâmetros funcionais nos pulmões de ratos com hipertensão arterial pulmonar .....	53
<b>4.2 CAPÍTULO II: artigo 2:</b> Extrato de mirtilo melhora o equilíbrio redox e parâmetros funcionais no ventrículo direito de ratos com hipertensão arterial pulmonar .....	88
<b>4.3 CAPÍTULO III: artigo 3:</b> Extrato de mirtilo atenua o estresse oxidativo e a apoptose induzidos por noradrenalina em células cardíacas H9c2 .....	121
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>152</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>166</b>
<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>167</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>168</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>182</b>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Imagem representativa do *Vaccinium myrtillus*.

**Figura 2:** Principais alterações dos mecanismos redox evidenciadas na HAP (adaptado de Aggarwal et al., 2013).

**Figura 3:** Visão geral do protocolo experimental desenvolvido nos estudos *in vivo*.

**Figura 4:** Efeitos do extrato de mirtilo sobre o tecido pulmonar em modelo de HAP induzida por monocrotalina.

**Figura 5:** Efeitos do extrato de mirtilo sobre o VD em modelo de HAP induzida por monocrotalina.

**Figura 6:** Resumo dos principais efeitos do extrato de mirtilo sobre o estado redox e vias de sinalização de morte/sobrevivência de cardiomiócitos cultivados na presença de noradrenalina.

## LISTA DE ABREVIações

AKT - proteína cinase B

ALK-1 - cinase do receptor tipo-1 de activina

ADMA - dimetilarginina assimétrica

BB - mirtilo/blueberry

BBE - extrato de mirtilo

BH<sub>4</sub> - tetrahidrobiopterina

BMPR2 - receptor de proteína morfogenética óssea tipo 2

CAT - catalase

CAV1 - caveolina-1

cGMP - guanosil monofosfato cíclico

DC - débito cardíaco

DCV - doenças cardiovasculares

DNA - ácido desoxirribonucleico

ENG - endoglina

eNOS - óxido nítrico sintase endotelial

EO - estresse oxidativo

ERN - espécies reativas de nitrogênio

EROs - espécies reativas de oxigênio

FoxO3a - proteína Forkhead-Box-O3a

GPx - glutatona peroxidase

GSH - glutatona reduzida

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

HAP - hipertensão arterial pulmonar

HAPI - hipertensão arterial pulmonar idiopática

HIV - vírus da imunodeficiência humana

HP - hipertensão pulmonar

KCNK3 - subfamília K do canal K de potássio

MCT - monocrotalina

NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NE - noradrenalina

NO - óxido nítrico

Nrf2 - fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

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

ONOO<sup>-</sup> - peroxinitrito

QL - quimioluminescência

SERCA - Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo sarcoendoplasmático

SOD - superóxido dismutase

STAT3 - transductor de sinal e ativador de transcrição 3

TAPSE - excursão sistólica do anel da tricúspide

TBOOH - hidróxido de tert-butil

TNF-α - fator de necrose tumoral

VD - ventrículo direito

VE - ventrículo esquerdo

WHO - Organização Mundial da Saúde

WU - unidade de wood

XO - xantina oxidase



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Mirtilo

#### 1.1.1 Papel da *berries* na saúde

As doenças cardiovasculares (DCVs) são a principal causa de morte no mundo, representando, aproximadamente, um terço de todas as mortes globalmente (World Health Organization, 2018). Entre os riscos modificáveis e os fatores preventivos no desenvolvimento e prevenção das DCV, o papel da dieta é crucial (MOZAFFARIAN et al., 2016). Ter como hábito uma dieta diversificada e equilibrada, com o consumo regular de frutas, vegetais, peixes e alimentos integrais, juntamente com uma restrição de sódio, gorduras saturadas e carboidratos refinados, são reconhecidos como fatores essenciais na prevenção primária e secundária de DCVs, de acordo com Associação Cardíaca Americana, o Colégio Americano de Cardiologia e a Sociedade Europeia de Cardiologia (PERK et al., 2012; ECKEL et al., 2014). Dentro desse quadro, diversos estudos têm sistematicamente associado o consumo de frutas e vegetais à redução do risco de doenças crônicas, como as DCVs (BOEING et al., 2012; VOLPE et al., 2019).

O consumo de pequenas frutas silvestres, denominadas *berries*, e sua contribuição para a melhoria da saúde cardiovascular é um assunto de considerável interesse. As *berries* mais comumente consumidas incluem morangos, amora, framboesa, açaí, groselha e mirtilo. Essas pequenas frutas são baixas em calorias e ricas em fibras, contendo antioxidantes naturais, como vitaminas C e E, e micronutrientes, como ácido fólico, cálcio, selênio, alfa e beta caroteno e luteína. Além disso, as *berries* apresentam elevada quantidade de fitoquímicos, que incluem polifenóis, juntamente com altas proporções de flavonóides, em especial antocianinas, compostos associados com a prevenção do desenvolvimento de DCVs (BASU et al., 2010).

De fato, diversos estudos epidemiológicos e clínicos fornecem evidências dos efeitos benéficos das *berries* sobre diferentes marcadores para DCVs, como diminuição de lipídios no sangue, redução da pressão arterial sistêmica, e melhora da função endotelial (RODRIGUEZ-MATEOS et al., 2014). Nesse sentido, destaca-se o estudo Kuopio - *Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor* - o qual acompanhou a dieta de mais de 2000 indivíduos de forma prospectiva, durante mais de uma década, e demonstrou a associação entre o

maior consumo de *berries* e a diminuição da mortalidade causada por DCVs na população finlandesa (RISSANEN et al., 2003). Além disso, outro estudo prospectivo, o Iowa Women's Health Study, demonstrou uma redução no risco de mortalidade relacionada às DCVs, especialmente devido à doença coronariana, entre mulheres que consumiam maiores quantidades de *berries* (MINK et al., 2007).

Em revisão conduzida por Basu et al. (2010) sobre o impacto das *berries* na saúde cardiovascular, a grande maioria dos trabalhos indicam um papel dos compostos fenólicos, em especial das antocianinas presentes nas *berries*, na diminuição significativa do dano oxidativo e da inflamação em modelos celulares e animais de DCV. A alta capacidade antioxidante desses compostos estaria relacionada com os efeitos benéficos do consumo desses frutos, que envolvem a diminuição da oxidação de LDL (LIU et al., 2008), diminuição da expressão de marcadores pró-inflamatórios como o TNF- $\alpha$  (YOU DIM et al., 2002) e aumento da síntese do importante vasodilatador óxido nítrico pela enzima eNOS (LAZZÈ et al., 2006). Nesse sentido, dentre as frutas que compõem a classe das *berries*, destaca-se o mirtilo (*Vaccinium myrtillus*), o qual exibe uma das maiores capacidades antioxidantes entre frutas e vegetais, superando as demais *berries* e outros alimentos funcionais (PERTUZATTIA et al., 2012).

### **1.1.2 Caracterização do fruto**

O mirtilo é uma fruta pequena (5-9 mm de diâmetro), de cor preto-azulada, com muitas sementes, cuja planta é nativa da Europa, porém também encontrada na América do Norte e Ásia. O crescimento da fruta é favorecido por clima temperado, sombra moderada e solo moderadamente úmido (CHU et al., 2011). Devido a essas condições, o mirtilo tem ganhado espaço no cenário da agricultura nacional, em especial no sul do país, sendo o Rio Grande do Sul o estado que mais se destaca na produção da fruta (CANTUARIAS-AVILÉS et al., 2014). O mirtilo é comercializado como frutas inteiras frescas, congeladas e secas, bem como na forma de conservas, geléias e sucos e, cada vez mais, concentrados líquidos ou em pó são vendidos como suplementos alimentares (CHU et al., 2011).



**Figura 1:** Imagem representativa do *Vaccinium myrtillus* (disponível na web em: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/287710.php>)

Em sua composição, o mirtilo contém uma variedade de compostos fenólicos, incluindo flavonóis (quercetina, catequinas), taninos e ácidos fenólicos, com destaque para a presença das antocianinas, as quais exercem a maior contribuição para sua mistura fitoquímica (SEERAM et al., 2008). Há muito que os compostos fenólicos são reconhecidos por proporcionar benefícios à saúde, porém, sua reputação tem sido evidenciada recentemente após vários estudos clínicos com diversificados perfis de doenças confirmarem sua eficácia. Como exemplo, o estudo *Prevención con Dieta Mediterránea* demonstrou que o risco do desenvolvimento de DCVs foi reduzido em 46% em indivíduos com uma dieta rica em polifenóis (TRESSERRA-RIMBAU et al., 2014). Outros trabalhos também mostraram a capacidade dos polifenóis em melhorar a função endotelial (VITA et al., 2005), inibir a agregação anormal de plaquetas (TANGNEY e RASMUSSEN, 2013), e reduzir a inflamação e melhorar o perfil lipídico plasmático (ARRANZ et al., 2012), oferecendo assim proteção à saúde cardiovascular em vários níveis.

### **1.1.3 Mirtilo e doenças cardiovasculares**

Em relação particularmente ao papel do mirtilo como promovedor de benefícios à saúde cardiovascular, alguns estudos já descreveram diferentes efeitos desse fruto. Em um modelo *in vitro* em que cardiomiócitos foram incubados na presença noradrenalina, Louis et al. (2014) demonstraram que o extrato de mirtilo foi capaz de prevenir a morte celular através da melhora do estado redox. Além disso, em um modelo animal de lesão cardíaca induzida por ciclofosfamida, Liu et al. (2015) reportaram que o tratamento com extrato de mirtilo rico em antocianinas nas doses de 20 e 80 mg/kg/dia levou à diminuição da pressão arterial média e da frequência cardíaca, ambas aumentadas nos

animais que receberam ciclofosfamida. O mesmo extrato também melhorou a disfunção diastólica, a hipertrofia e a fibrose do ventrículo esquerdo, diminuindo o infiltrado inflamatório e a expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido cardíaco. Em outro modelo *in vivo*, conforme Ahmet et al. (2009) animais que se alimentaram durante 3 meses com uma dieta enriquecida com mirtilos sofreram lesão isquêmica cardíaca através do ligamento da artéria coronária descendente esquerda. Comparados aos animais que receberam a dieta padrão, os indivíduos que se alimentaram com mirtilo exibiram menor área de infarto, com menor presença de células inflamatórias observadas na área peri-infartada e diminuição da apoptose de cardiomiócitos. Também apresentaram atenuação das pioras funcionais do ventrículo esquerdo, demonstrando, por exemplo, maior fração de ejeção em comparação com os animais infartados que não receberam a dieta com mirtilos. Nesse mesmo sentido, Eladwy et al. (2018) trataram animais que tiveram dano miocárdico induzido por isoprenalina com um extrato das folhas de mirtilo nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia durante quatro semanas. Esses animais exibiram melhoras eletrocardiográficas, com diminuição da amplitude das ondas T e R, associadas à diminuição da fibrose e inflamação cardíaca.

Ainda, em relação a trabalhos mais recentes, no estudo de Hu et al. (2019), em modelo animal de disfunção miocárdica induzida por constrição aórtica transversa, camundongos tratados com extrato de mirtilo enriquecido com antocianinas manifestaram menor hipertrofia, fibrose e disfunção ventricular esquerda, resultados associados à melhora do perfil inflamatório e do estado redox, com consequente redução de apoptose de cardiomiócitos. O trabalho de Curtis et al. (2019) o qual se caracteriza por ser um ensaio clínico controlado, randomizado e duplo-cego, com acompanhamento de 6 meses, traz evidências sólidas dos benefícios do consumo de mirtilos sobre a saúde cardiovascular em humanos. Nesse trabalho, indivíduos com síndrome metabólica que consumiram diariamente uma dose de 150g de mirtilos apresentaram melhora da função endotelial e da rigidez arterial sistêmica, resultados relacionados à melhora do perfil lipídico plasmático e maior disponibilidade de óxido nítrico.

#### **1.1.4 Mirtilo como antioxidante**

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs,

respectivamente) são compostos altamente reativos, tanto radicais e não-radicaais, que podem interagir com várias moléculas biologicamente relevantes (por exemplo, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos), comprometendo potencialmente sua função, alterando vias metabólicas e levando ao desequilíbrio homeostático (SILVA et al., 2018). No entanto, as células possuem mecanismos que lhes permitem superar o desafio oxidativo, através de defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas (SIES, 2007). Em alguns casos, devido a uma produção excessiva ou uma eliminação deficiente de espécies reativas, desequilíbrios entre a quantidade de EROs/ERNs presentes e a capacidade antioxidante celular de lidar com esse quadro levam ao surgimento do estresse oxidativo, situação que está associada ao desenvolvimento de várias patologias, como doenças degenerativas, câncer, e DCVs (SILVA et al., 2018). Um aumento no consumo de antioxidantes exógenos capazes de interagir com os radicais originando compostos estáveis e prevenindo a oxidação de biomoléculas, pode ser uma maneira de lidar com o estresse oxidativo.

Nesse sentido, as vantagens do consumo do mirtilo à saúde estão fortemente associadas a melhorias do equilíbrio redox, principalmente através do estímulo às defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, levando à diminuição dos danos oxidativos celulares. Em modelo de dano hepático induzido por radiação, o extrato de mirtilo protegeu hepatócitos através do aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e aumento do conteúdo de glutathionas reduzidas, uma das principais defesas antioxidantes não-enzimáticas. Além disso, reduziu a atividade da enzima pró-oxidante xantina oxidase (ALKHALF et al., 2018). Em outro estudo envolvendo um modelo de lesão hepática, o papel protetor do extrato de mirtilo foi relacionado ao aumento da atividade de SOD, com consequente atenuação de danos lipídicos em hepatócitos (LIU et al., 2019). Em animais diabéticos, o extrato de mirtilo foi capaz de aumentar a atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx), bem como os níveis de glutathionas reduzidas, com consequente diminuição de danos oxidativos às retinas desses animais (SONG et al., 2016).

Em relação às melhoras do estado redox em modelos de DCVs, conforme reportado por Sun et al. (2019) o extrato de mirtilo protegeu cardiomiócitos contra a apoptose através da diminuição das EROs em um modelo *in vitro* de dano

induzido por doxorubicina. O extrato de mirtilo foi capaz de aumentar as atividades das enzimas antioxidantes SOD e catalase, promovendo a sobrevivência de cardiomiócitos na presença de altas concentrações de noradrenalina (LOUIS et al., 2014).

Ainda, em modelo de dano cardíaco induzido por ciclofosfamida, a suplementação de animais com extrato de mirtilo levou ao aumento da atividade da SOD e dos níveis de glutatona reduzidas. Esses efeitos levaram à diminuição do dano lipídico cardíaco, culminando na melhora da função ventricular esquerda (LIU et al., 2015). Em outro modelo *in vivo* de disfunção cardíaca causada por exposição a material particulado, também foi verificada a capacidade do extrato de mirtilo em elevar a atividade da SOD e atenuar os aumentos nos níveis de malondialdeído, marcador de dano oxidativo a ácidos graxos. Esses resultados foram associados com diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias e diminuição da expressão de endotelina-1 e angiotensina II, moléculas que apresentam níveis elevados em situação de insuficiência cardíaca (WANG et al., 2017).

## **1.2 Hipertensão Arterial Pulmonar**

### **1.2.1 Definição e Diagnóstico**

A hipertensão pulmonar (HP) é uma comorbidade comum a muitas doenças cardíacas e pulmonares, para as quais a condição do leito vascular pulmonar frequentemente é a principal determinante das manifestações clínicas, do prognóstico e da exequibilidade do tratamento. Em situação fisiológica, a circulação pulmonar apresenta baixa resistência, sendo as pressões sistólica e diastólica na faixa de 15 a 25 mmHg e 5 a 10 mmHg, respectivamente, em indivíduos normais na posição supina. A grande área agregada da circulação pulmonar é responsável por essa baixa resistência, que se reflete na escassez da musculatura dos vasos de resistência pulmonares, no grande escape de sangue da árvore arterial pulmonar durante cada sístole, na grande capacidade e expansibilidade da árvore arterial pulmonar e no grande número de minúsculos vasos mantidos em reserva (Goldman Cecil Medicina, 2010).

A HP tem sido caracterizada em indivíduos que apresentam uma pressão média na artéria pulmonar (PMAP)  $\geq 25$  mmHg em repouso. O normal em indivíduos saudáveis é o valor de PMAP de até 20 mmHg, sendo que pessoas

com pressões entre 21 e 24 mmHg devem ser monitoradas cuidadosamente, particularmente quando apresentarem risco para o desenvolvimento da hipertensão arterial pulmonar (situações em que há casos na família de hipertensão arterial pulmonar hereditária, por exemplo) (HOEPER et al., 2013). Ainda, o subgrupo da HP conhecido como hipertensão arterial pulmonar (HAP) apresenta o critério de que a pressão de oclusão da artéria pulmonar deve ser  $\leq$  15 mmHg (BADESCH et al., 2009).

A HP é classificada em cinco grandes grupos: (1) hipertensão arterial pulmonar; (2) hipertensão pulmonar devido a doenças cardíacas do lado esquerdo; (3) hipertensão pulmonar devido a doenças pulmonares e/ou hipóxia; (4) hipertensão pulmonar crônica tromboembólica; (5) hipertensão pulmonar com mecanismo multifatoriais desconhecidos (SIMONNEAU et al., 2013) (Tabela 1).

Em relação à HAP, a qual compreende o grupo 1, sua origem pode ocorrer de diversas formas: idiopática; hereditária (principalmente devido a mutações no gene onde se localiza o receptor tipo 2 da proteína morfogenética óssea – BMPR2); associada com drogas ou toxinas; ou ser decorrente de condições associadas com HAP (como, por exemplo, infecção por HIV, doenças do tecido conjuntivo, hipertensão portal, esquistossomose, entre outras causas).

**Tabela 1.** Classificação da Hipertensão Pulmonar baseada no Quinto Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar, 2013.

<b>Grupo 1: Hipertensão Arterial Pulmonar</b>
1.1 Idiopática
1.2 Hereditária
1.2.1 BMPR2
1.2.2 ALK-1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3
1.2.3 Desconhecida
1.3 Induzida por drogas ou toxinas
1.4 Associada com:
1.4.1. Doença do tecido conectivo
1.4.2 Infecção por HIV
1.4.3 Hipertensão portal
1.4.4 Doenças cardíacas congestivas

1.4.5 Esquistossomose
1' Doença veno-oclusiva pulmonar e/ou hemangiomatose dos capilares pulmonares
1'' Hipertensão pulmonar persistente do recém nascido
<b>Grupo 2: Hipertensão pulmonar devido a doença cardiovascular esquerda</b>
2.1 Disfunção ventricular sistólica esquerda
2.2 Disfunção ventricular diastólica esquerda
2.3 Doença valvular
2.4 Obstrução do fluxo cardíaco esquerdo e cardiomiopatias congênitas
<b>3. Hipertensão pulmonar devido a doenças pulmonares e/ou hipóxia</b>
3.1 Doença obstrutiva pulmonar crônica
3.2 Doença intersticial pulmonar
3.3 Outras doenças pulmonares com padrão restritivo e obstrutivo
3.4 Distúrbios respiratórios do sono
3.5 Distúrbios da hipoventilação alveolar
3.6 Exposição crônica à altitude
3.7 Anomalias do desenvolvimento pulmonar
<b>4. Hipertensão pulmonar devido à trombose crônica ou embolismo</b>
<b>5. Hipertensão pulmonar com mecanismos multifatoriais</b>
5.1 Distúrbios hematológicos: anemia crônico-hemolítica, esplenectomia
5.2 Distúrbios sistêmicos: sarcoidose, histiocitose pulmonar
5.3 Distúrbios metabólicos: distúrbios da tireoide, doença de Gaucher
5.4 Obstrução tumoral, falência renal crônica, hipertensão pulmonar segmental

Como na HAP há perda da capacidade do leito vascular pulmonar de se dilatar e recrutar uma vasculatura não utilizada para acomodar aumentos no fluxo sanguíneo, ocorre aumento da pressão na artéria pulmonar e hipertrofia do ventrículo direito em resposta à elevação de pós-carga. Esse quadro, que resulta na progressiva disfunção ventricular direita, recebe o nome de *cor pulmonale*.

O *cor pulmonale* se origina da sobrecarga de pressão ao ventrículo direito (VD) e é caracterizado por hipertrofia, dilatação e insuficiência do VD secundária à hipertensão pulmonar. No *cor pulmonale* crônico pode ocorrer também a compressão da câmara ventricular esquerda em decorrência do ventrículo direito hipertrofiado, causando desvio do septo interventricular (HOWARD et al., 2012). Estima-se que o *cor pulmonale* represente cerca de 7 a 10% de todas as doenças cardíacas (LEHRMAN et al., 2002).



Os sintomas iniciais da HAP, como dispneia, tontura e fadiga são geralmente suaves e comuns a diversas outras doenças. Em repouso, inicialmente, não se observa sintomas ou sinais aparentes da doença. Como resultado, o tempo do estabelecimento da doença até o diagnóstico é, em média, maior de 2 anos (HUMBERT et al. 2006; BADESCH et al. 2010). Além disso, a HAP é uma doença de difícil diagnóstico, que requer investigações invasivas e significativa experiência no cuidado com os pacientes. Assim, as diretrizes atuais recomendam que os pacientes devam ser avaliados por centros especializados para diagnóstico e tratamento de doenças pulmonares (GAINE e RUBIN, 1998; BARST et al., 2009).

O cateterismo cardíaco direito é necessário para avaliar a gravidade da insuficiência hemodinâmica, para testar a vasoreatividade da circulação pulmonar e para um diagnóstico definitivo de HAP. Os seguintes parâmetros geralmente são avaliados: pressão do átrio direito (PAD); pressão arterial pulmonar (PAP) sistólica, diastólica e média; débito e índice cardíaco; resistência vascular pulmonar (RVP) e resistência vascular sistêmica (RVS); pressão arterial sistêmica; saturação de oxigênio no sangue arterial e venoso (BADESCH et al., 2009). Embora o cateterismo tenha se tornado ao longo dos anos um procedimento relativamente seguro, é invasivo e pouco prático para executar em pacientes para o qual ele não está claramente indicado.

A ecocardiografia transtorácica é uma ferramenta que vem sendo utilizada para rastreio de pacientes em risco de HAP, mesmo não sendo utilizada para confirmação definitiva da presença ou ausência da HAP. Com base numa avaliação ecocardiográfica, os pacientes que apresentam sinais sugestivos de HAP devem ser encaminhados para o cateterismo cardíaco direito (HABIB e TORBICKI, 2010). A HAP severa frequentemente causa dilatação do átrio e ventrículo direito, modificação do septo interventricular, disfunção do ventrículo direito e dilatação das veias cavas, bem como das veias hepáticas (BOSSONE et al., 1999). Medições do diâmetro basal e da área do ventrículo direito no final da diástole têm sido reportadas como maiores nos indivíduos com HAP (LANG, et al., 2006). Também algumas medidas utilizando a ecocardiografia doppler têm sido correlacionadas com o aumento da pressão arterial pulmonar. Entre elas, destaca-se o pico da velocidade de ejeção do ventrículo direito (tempo de aceleração), o qual se apresenta diminuído com o aumento da pressão arterial

pulmonar (KITABATAKE et al., 1983). A razão das velocidades máximas do pico E (enchimento lento do ventrículo direito) e pico A (enchimento tardio do ventrículo direito) medidas no fluxo da tricúspide se mostra menor em pacientes com hipertensão pulmonar (YU et al., 1996). Outro parâmetro simples para avaliar a função do ventrículo direito é medindo-se a excursão sistólica no plano do anel da tricúspide (TAPSE). O TAPSE é um bom parâmetro para investigação da função ventricular direita, uma vez que fibras longitudinais são predominantes no ventrículo direito. Os valores normais estão severamente reduzidos em caso de disfunção ventricular direita (UETI et al., 2002).

Dessa forma, a ecocardiografia continua a ser o método não-invasivo mais útil clinicamente que permite avaliação multidimensional da circulação pulmonar. A ecocardiografia tem um papel fundamental no diagnóstico da HAP através da identificação de pacientes para os quais o cateterismo do ventrículo direito é justificado, facilitando o diagnóstico precoce (HABIB e TORBICKI, 2010).

### **1.2.2 Epidemiologia**

A estimada incidência da HAP varia regionalmente no mundo, se mostrando, por exemplo, de 15 casos por milhão em adultos na França a 25 casos por milhão em adultos na Escócia (HUMBERT et al., 2006; PEACOCK et al., 2007). A exata prevalência da doença também é desconhecida, podendo ser largamente subestimada. Nos Estados Unidos, cerca de 200 mil hospitalizações anualmente tem a hipertensão pulmonar como causa primária ou secundária. Se estima uma prevalência na Europa de 0,3 – 6% (MOCUMBI et al., 2015). Há hoje pelo menos 11 grandes estudos de registros de pacientes com HAP (AWDISH e CAJIGAS, 2015). O primeiro estudo, realizado de 1981 a 1985 pelo National Institutes of Health (NIH), demonstrou uma idade média de diagnóstico de  $36 \pm 15$  anos e média de sobrevivência de 2,8 anos para a HAP (RICH et al., 1987). Estudos mais recentes, mostram médias de sobrevivência maiores, como um estudo retrospectivo realizado no Japão, em que os pacientes apresentaram média de sobrevivência de  $14,9 \pm 0,8$  anos com taxas de sobrevivência em 1, 5 e 10 anos de 98%, 96% e 78% respectivamente. Essa melhora foi relacionada com uma maior taxa de prescrições de drogas para tratamento da HAP (OGAWA et al., 2014). Também houve um aumento na idade média de diagnóstico,

chegando a  $65 \pm 15$  anos em estudos prospectivos como o COMPERA (HOEPER et al., 2013). Desfechos como declínio na distância percorrida no teste de 6 minutos de caminhada, maior risco de hospitalização, necessidade de transplante ou morte estão mais presentes em pacientes diagnosticados acima de 55 anos (KODUR et al., 2015).

Mudanças na epidemiologia da hipertensão pulmonar podem ter sido influenciadas por fatores independentes da patologia em si, como modificações na sua classificação, maior precisão no diagnóstico e maior acesso aos tratamentos. Entre os pacientes, se observa um maior número de mulheres acometidas pela doença em comparação com homens, sendo a razão dessa preponderância ainda desconhecida (HUMBERT et al., 2006; MCGOON et al., 2013). A apresentação clínica não parece ser diferente entre os sexos, porém, a idade média de diagnóstico da doença se mostra menor em mulheres. Uma vez estabelecido o quadro da doença, homens apresentam maior risco de mortalidade apesar do mesmo tratamento. Essa situação parece estar ligada à influência dos hormônios sexuais, em especial ao estrogênio, o qual pode favorecer o desenvolvimento da doença, mas também diminuir os desfechos desfavoráveis (MANES et al., 2012).

Há poucos estudos epidemiológicos da HAP no Brasil, sendo o mais completo e recente de 2014 (ALVES et al., 2014). Nesse trabalho, um estudo prospectivo de casos incidentes, em um total de 178 pacientes com HP entre 2008 e 2013, se observou uma média de idade de 46 anos no diagnóstico e uma razão mulheres/homens de 3,3:1. A HAP idiopática apareceu como a mais comum (28,7%), seguida da HAP causada por doença do tecido conectivo (25,8%) e esquistossomose (19,7%). É importante salientar a esquistossomose como uma das principais causas associadas com a HAP, uma doença comum em países em desenvolvimento e com precárias condições de saneamento básico. A estimativa de casos de esquistossomose no mundo é de 200 milhões de pessoas afetadas, principalmente nas áreas da África, América do Sul, Caribe, Oriente Médio e Ásia, levando a crer que essa doença é a principal causa sub-reconhecida da HAP (MOCUMBI et al., 2015).

Ainda no estudo brasileiro, viu-se que 66% dos pacientes usavam como terapia de primeira linha inibidor de fosfodiesterase tipo 5 (Sildenafil), enquanto 27% utilizavam antagonista de receptor de endotelina-1 (Bosentan). O

acompanhamento do perfil epidemiológico da doença nas últimas décadas permite refletir sobre o progresso das terapias e o avanço dos diagnósticos, bem como reconhecer as características regionais das populações afetadas, o que contribui para a adaptação de diretrizes voltadas para determinados grupos de pacientes.

### 1.2.3 Patobiologia da HAP

As diferentes categorias da HAP diferem na sua causa, porém todas são caracterizadas por vasoconstrição pulmonar excessiva junto de um processo de remodelamento vascular anormal que usualmente afeta todas as camadas do vaso e resulta em severa perda de área de secção transversa. Como consequência, há um aumento da resistência vascular pulmonar que resulta em sobrecarga de pressão ao ventrículo direito. A complacência diminuída da artéria pulmonar também contribui para o aumento de trabalho e a distensão do ventrículo direito. Mudanças na túnica íntima incluem dano endotelial, proliferação de células endoteliais, invasão da íntima por células tipo miofibroblastos, aumento da deposição de matriz extracelular levando à fibrose e, muitas vezes, obstrução do lúmen vascular em decorrência das lesões plexiformes (SCHERMULY et al., 2011). Uma outra característica bem proeminente presente na HAP é proliferação de células musculares lisas, as quais se estendem até pequenas artérias pulmonares não muscularizadas da região dos ácinos pulmonares (HUMBERT et al., 2004). Essas mudanças estruturais sugerem a mudança de um estado quiescente para um fenótipo proliferativo e resistente à apoptose na doença.

A produção de mediadores da vasodilatação, em especial a prostaglandina I<sub>2</sub>, está diminuída na HAP, o que pode ser responsável por um aumento da produção de tromboxano A<sub>2</sub> e na conseqüente maior agregação plaquetária observada em alguns casos (CHRISTMAN et al., 1992). Níveis diminuídos de óxido nítrico (potente molécula vasodilatadora e antiproliferativa) e cGMP (segundo mensageiro, *downstream* ao óxido nítrico) têm sido descritos na HAP, o que levou a testes do fármaco Sildenafil em pacientes no final da década de 90 e início dos anos 2000, hoje aprovado para o tratamento da HAP (GHOFRANI et al., 2006). Além disso, o substrato da síntese de NO pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), o aminoácido L-arginina, pode ser metilado

endogenamente levando à formação da dimetil-arginina assimétrica ou simétrica. Ambas as formas têm papel na diminuição da formação de NO através da inibição da NOS (dimetil-arginina assimétrica) ou diminuição da captação de arginina (dimetil-arginina simétrica) e apresentam níveis plasmáticos e níveis no tecido pulmonar elevados em pacientes com HAP idiopática (PULLAMSETTI et al., 2005).

Adicionalmente aos níveis reduzidos de mediadores da vasodilatação, se observa níveis aumentados dos vasoconstritores tromboxano e endotelina-1 (CHRISTMAN et al., 1992). O tromboxano é tanto um agente vasoconstritor como pró-agregatório, facilitando a agregação plaquetária e a interação das plaquetas com o endotélio, levando à trombose da vasculatura pulmonar (TOURNIER et al., 2010). Da mesma forma, a endotelina-1 atua não só aumentando o tônus vascular, mas também agindo de forma a promover um estímulo mitogênico ao atuar sobre os receptores  $ET_A$  e  $ET_B$  de células musculares lisas (DAVIE et al., 2002). Ainda é importante ressaltar o papel da 5-hidroxitriptamina (serotonina) na vasoconstrição, uma vez que estudos com pacientes com HAP idiopática e modelos experimentais de HAP mostram o aumento de produção de 5-HT por células endoteliais pulmonares, bem como sua maior atividade parácrina sobre células musculares lisas adjacentes (LAUNAY et al., 2002). A manutenção do influxo de cálcio também gera a ativação da via  $Ca^{2+}$ -calmodulina-dependente do ciclo celular com consequente efeitos mitogênicos sobre as células musculares lisas da vasculatura pulmonar, levando à hiperplasia (BURG et al., 2008).

Diversos fatores de crescimento estão implicados na HAP e no remodelamento vascular. Ao se ligarem e ativarem receptores tirosina-cinase da superfície celular, esses fatores atuam como potentes mitogênicos para células vasculares, como células endoteliais, musculares lisas e miofibroblastos. A ativação desses receptores inicia uma cascata de sinalização intracelular resultando em proliferação e migração celular, bem como resistência à apoptose. Entre esses fatores encontra-se o TGF- $\beta$ , o EGF e o PDGF. Não é claro quais mecanismos levam à indução desses fatores de crescimento, embora espécies reativas de oxigênio têm sido implicadas (HUMBERT et al., 2004).

#### **1.2.4 Ativação simpática na HAP**

Após qualquer tipo de dano miocárdico, a ativação adrenérgica ocorre de forma instantânea e é o principal meio de proporcionar aumento da frequência cardíaca e da contratilidade, dois mecanismos compensatórios disponíveis para estabilizar a função cardíaca. No entanto, a estimulação adrenérgica sustentada leva a efeitos adversos sobre o coração, incluindo apoptose de cardiomiócitos e metabolismo de cálcio alterado, acelerando a disfunção miocárdica (BRISTOW e QUAIFFE, 2015).

Semelhante ao ventrículo esquerdo na insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida, o VD na HAP apresenta ativação adrenérgica, aproximadamente na mesma extensão (MAK et al., 2012). Como consequência dessa ativação, os receptores adrenérgicos do VD na HAP apresentam expressão diminuída, em um grau semelhante ao da insuficiência do VE. A regulação negativa dos receptores adrenérgicos no miocárdio é um biomarcador de exposição à estimulação adrenérgica excessiva. Além disso, a ativação adrenérgica no VD de pacientes com HAP é específica da câmara, o que significa que ocorre apenas na câmara que está acometida pela doença (BRISTOW et al., 1992). Embora as catecolaminas sejam responsáveis por efeitos cardiotóxicos diretos no miocárdio, seus efeitos podem desencadear outros mecanismos importantes envolvidos no remodelamento cardíaco. Maior atividade do sistema nervoso simpático e elevados níveis circulantes de noradrenalina no plasma de indivíduos com HAP já foram correlacionados com aumentos na resistência vascular pulmonar e menor sobrevivência em um período de 5 anos (VAILLANCOURT et al., 2017). Nesse sentido, alguns estudos mostram que a administração de antagonistas adrenérgicos evita o desenvolvimento da HAP induzida por monocrotalina, mantendo as pressões cardiopulmonares abaixo do limiar patológico, diminuindo a hipertrofia ventricular direita e aumentando a sobrevivência de animais (ISHIKAWA et al., 2009; OKUMURA et al., 2015).

A ativação adrenérgica desempenha seus papéis deletérios sobre cardiomiócitos a longo prazo via geração de um quadro de estresse oxidativo. Lima-Seolin et al. (2019) relataram aumento dos níveis de EROs totais, bem como do marcador de dano lipídico 4-hidroxinonenal em modelo de cardiomiócitos cultivados na presença de noradrenalina, resultados que foram associados à morte celular. No mesmo sentido, a exposição de células cardíacas

à noradrenalina também levou à depleção das defesas antioxidantes, com diminuição das atividades das enzimas SOD e catalase, culminado com ativação de caspases (LOUIS et al., 2014). Em estudo *in vivo*, animais que receberam administração de noradrenalina apresentaram diminuição da razão glutatona reduzidas/oxidadas bem como elevados níveis do marcador de dano lipídico malondialdeído no tecido cardíaco, dados relacionados com alterações eletrocardiográficas e apoptose de cardiomiócitos (NERI et al., 2007).

### **1.2.5 Modelo animal para a HAP: Monocrotalina**

O uso de modelos animais tem contribuído extensivamente para o atual entendimento da fisiopatologia e para a investigação de tratamentos experimentais na hipertensão pulmonar (MAARMAN et al., 2013). Levanta-se por vezes preocupações com os modelos animais não apresentarem a completa severidade da hipertensão pulmonar observada em humanos em respeito a parâmetros histológicos e hemodinâmicos. Porém, a possibilidade de que a HP em humanos pode já estar em estágio avançado na progressão da doença quando da sua descoberta, torna essa comparação incorreta. Apesar dos modelos animais não recapitularem completamente a severidade da hipertensão pulmonar em humanos, eles podem ser muito bem correlacionados com formas mais suaves e moderadas da hipertensão pulmonar em humanos, um estágio que geralmente escapa no momento do diagnóstico (MAARMAN et al., 2013).

A monocrotalina (MCT), um alcaloide derivado da planta *Crotalaria spectabilis*, é conhecida por sua habilidade de causar hepatotoxicidade e hipertensão pulmonar. Em geral, tem sido utilizada em ratos a dose de 60-80mg/kg administrada via subcutânea ou intraperitoneal (GOMEZ-ARROYO et al., 2012). A resposta à monocrotalina varia entre as espécies por conta das diferenças na farmacocinética da MCT envolvendo sua degradação e a formação hepática do seu derivado pirrólico ou excreção (BARMAN et al., 2009). A espécie preferida para o estudo da HAP induzida por MCT é atualmente o rato (NOGUEIRA-FERREIRA et al., 2015). Dentro de uma semana, os ratos apresentam anorexia, apatia, incapacidade de ganhar peso e taquipnéia. À medida que a lesão pulmonar e o remodelamento vascular progridem, os ratos desenvolvem graus variáveis de dispnéia, fraqueza, diarreia e cianose periférica (SCHOENTAL e HEAD, 1955). Menores espécies, tais como camundongo, além

de ser mais difícil de se realizar ecocardiografia e cateterismo, raramente desenvolvem significativa HAP, têm menor grau de hipertrofia do VD e remodelamento arterial pulmonar (RYAN et al., 2013).

O mecanismo pelo qual a MCT causa HAP inclui o metabolismo da MCT no fígado pela enzima citocromo-P450 em derivados pirrólicos, em especial a dehidromonocrotalina, que iniciam um dano endotelial na vasculatura pulmonar (SHAH et al., 2005). Embora o mecanismo exato através do qual a MCT provoca HAP não ser conhecido, especula-se por muitos que o composto provoque lesão endotelial direta que, em seguida, aciona o inexorável desenvolvimento e progressão severa e eventualmente letal da HAP (JASMIN et al., 2001). Outros investigadores sugerem que o aumento da pressão arterial pulmonar e o remodelamento vascular é precedido por um forte acúmulo de células inflamatórias mononucleares na camada adventícia de vasos intra-acinares (WILSON et al., 1989).

Dentro de horas após a exposição do animal à monocrotalina, já se observa danos no endotélio vascular. Na primeira semana, pode-se perceber um aumento do dano endotelial, com presença de infiltrado inflamatório e edema. Na segunda semana já se observa o aumento da pressão arterial pulmonar (WEST e HEMNES, 2011). O dano endotelial é o gatilho inicial para a vasculite pulmonar e o remodelamento pulmonar obstrutivo, caracterizado pelo estreitamento ou obliteração do lúmen vascular.

A histologia da vasculatura pulmonar nesse modelo mostra hiperplasia da íntima, hipertrofia da camada média e engrossamento da camada adventícia (STENMARK et al., 2009). A HAP no modelo utilizando MCT é também caracterizada por aumento de apoptose das células endoteliais, proliferação de células musculares lisas da artéria pulmonar e resistência dessas células à apoptose (SHAH et al., 2005). Outros estudos realizados com o modelo de MCT também destacam o papel essencial de células inflamatórias (macrófagos, células dendríticas e mastócitos) e citocinas (interleucinas 1 e 6) nos estágios iniciais do remodelamento vascular observado na HAP (DAHAL et al., 2011; SAVAI et al., 2012). A MCT não apenas causa danos às artérias pulmonares mas também induz edema alveolar e fibrose intersticial pulmonar (GOMEZ-ARROYO et al., 2011). O modelo de MCT para estudo da HAP continua sendo utilizado com frequência, uma vez que ele oferece simplicidade técnica,



reprodutibilidade e baixo custo quando comparado com outros modelos (GOMEZ-ARROYO et al., 2012).

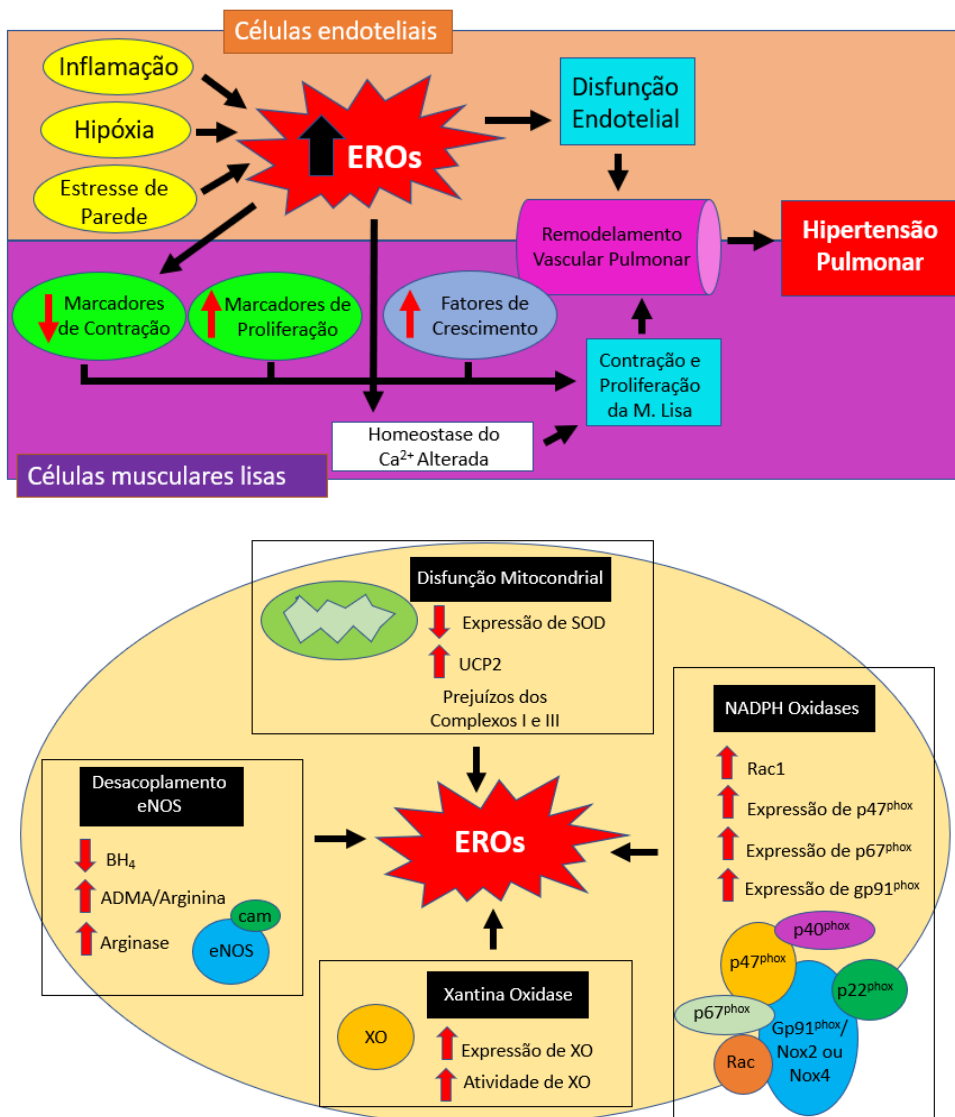
### **1.2.6 Estresse oxidativo na HAP**

Além dos desequilíbrios entre vasodilatores e vasoconstritores já citados, temos a contribuição do estresse oxidativo na HAP. O papel patogênico das espécies reativas de oxigênio (EROs – como o superóxido, os radicais hidroxila, peroxila e hidroxiperoxila) e de nitrogênio (ERNs – como o óxido nítrico, dióxido de nitrogênio, trióxido de nitrogênio e peróxido nitrito) na HAP foi recentemente revisado por Aggarwal et al. (2013). Já é bem reconhecido que o estresse oxidativo contribui para o desenvolvimento e progressão de diversas doenças vasculares incluindo a modulação da inflamação na HAP, o metabolismo energético, a proliferação e diferenciação celular e a apoptose (MONTANI et al., 2014).

Genes responsivos ao estresse oxidativo (como o da enzima tioredoxina) já mostraram um aumento de sua expressão no pulmão de indivíduos com HAP (GERACI et al., 2001). Além disso, os níveis de isoprostano, uma prostaglandina derivada da peroxidação de ácidos graxos essenciais, parecem estar elevados na urina de pacientes com HAP e se correlacionam com uma pior taxa de sobrevida (CRACOWSKI et al., 2012). Um dos principais radicais livres discutidos na HAP é o óxido nítrico. De maneira geral, há um consenso que a sinalização desencadeada pelo óxido nítrico na HAP está prejudicada (TABIMA et al., 2012), mesmo que haja divergência entre estudos quando se analisa a atividade da enzima eNOS. Enquanto alguns estudos demonstram o aumento da atividade da eNOS, outros mostram sua redução (XUE e JOHNS, 1995; GIAD e SALEH, 1995; SHARMA et al., 2008). Um dos possíveis mecanismos que explicam a sinalização do óxido nítrico prejudicada é o desacoplamento da enzima eNOS, situação em que há formação de superóxido em detrimento de óxido nítrico (CRABTREE, et al., 2009; KARUPPIAH et al., 2011). Também já se demonstrou um decréscimo nos níveis de subunidades da proteína guanilato ciclase (com conseqüente menor geração de cGMP – responsável por ativar vias de sinalização que levam à vasodilatação e diminuição da agregação plaquetária como efeitos finais) e diminuição de sua atividade dependente de óxido nítrico, levando a uma diminuição do relaxamento da vasculatura na HAP (DERUELLE

et al., 2005). Não apenas a alteração na sinalização do óxido nítrico, como também outros fatores relacionados com a produção de EROs levam à HAP. Há indícios de que uma maior produção de EROs, principalmente superóxido e peróxido de hidrogênio, possa estar aumentada na HAP em consequência de uma maior ativação das enzimas NADPH oxidases – as quais utilizam o NADPH como doador de elétrons para formação de  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  (DEMARCO et al., 2008; NISBET et al., 2010). Outra enzima, a xantina oxidoreductase, fisiologicamente responsável pela degradação das purinas, tende a se transformar em xantina oxidase sob condições principalmente inflamatórias, gerando  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$ . Esta tem se mostrado aumentada nas artérias de pacientes com HAP (SPIEKERMANN et al., 2009). Ao se analisar o estresse oxidativo na HAP, discute-se a importância da função mitocondrial. Uma pequena quantidade de  $O_2$  não consegue ser reduzida à água e é convertida em  $O_2^{\cdot-}$  na cadeia transportadora de elétrons (ETC), mesmo em situação fisiológica (BOVERIS e CHANCE, 1973). A conversão do superóxido em  $H_2O_2$  na mitocôndria ocorre pela enzima superóxido dismutase 2 (SOD2) e é importante uma vez que o  $H_2O_2$  pode estimular diversas vias de sinalização e contribuir para regulação do tônus da vasculatura e modulação da proliferação celular e da apoptose (TABIMA et al., 2012). Há duas formas distintas de abordar o papel da mitocôndria na HAP. A primeira seria uma disfunção na ETC mitocondrial levando à superprodução de EROs (devido a uma menor atividade de SOD2, por exemplo), promovendo senescência, necrose e apoptose, levando à vasculopatia (WOLIN et al., 2005). A segunda teoria se baseia no fato de uma disfunção mitocondrial gerar uma troca do metabolismo oxidativo para a glicólise anaeróbica e levar a uma menor produção de EROs. Esse processo pode ocasionar concomitantemente um acúmulo de equivalentes reduzidos de NADPH e  $FADH_2$  e culminar com a diminuição do potencial redox celular, o que poderia, por exemplo, facilitar uma despolarização da célula e aumento do cálcio intracelular, levando à vasoconstrição das células musculares lisas na artéria pulmonar (ARCHER et al., 2010). Diversos trabalhos também já mostraram os efeitos benéficos de terapias ou intervenções que têm as EROs e ERNs como alvos no estudo da HAP, como o uso de substâncias que evitam o desacoplamento de eNOS (WUNDERLICH et al., 2008), superexpressão de SOD nas células endoteliais da vasculatura pulmonar (NOZIK-GRAYCK et al., 2008) e inibidores da oxidação de

ácidos graxos (SUTENDRA et al., 2003). A figura 2 ilustra alguns dos mecanismos de desequilíbrio redox já evidenciados na HAP.



**Figura 2:** Principais alterações dos mecanismos redox evidenciadas na HAP (adaptado de Aggarwal et al., 2013).

Porém, até o presente momento, intervenções dietoterápicas ainda não foram abordadas na HAP, com o potencial terapêutico de antioxidantes naturais não tendo sido explorado.

## 2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

### 2.1 Hipótese

**H<sub>0</sub>:** O extrato de mirtilo não promove benefícios sobre as alterações redox, morfo-funcionais e hemodinâmicas induzidas pela HAP.

**H<sub>1</sub>:** O extrato de mirtilo promove benefícios sobre as alterações redox, morfo-funcionais e hemodinâmicas induzidas pela HAP.

### 2.2 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do extrato de mirtilo *in vivo* sobre a hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina, verificando sua atuação sobre parâmetros morfo-funcionais e hemodinâmicos, bem como sua modulação do estado redox. Ainda, para avaliar os mecanismos moleculares envolvidos neste contexto, o desenvolvimento de um modelo *in vitro* de lesão de cardiomiócitos induzida por noradrenalina também foi alvo desta tese.

#### 2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver o modelo animal de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina.
- Avaliar a composição do extrato de mirtilo em relação aos seus principais componentes fenólicos.
- Determinar a dose efetiva do extrato de mirtilo em ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina.
- Realizar as análises dos parâmetros morfométricos de hipertrofia do ventrículo direito e dos parâmetros hemodinâmicos e funcionais do ventrículo direito e pulmões.
- Verificar o papel do extrato de mirtilo sobre o equilíbrio redox no tecido pulmonar e ventrículo direito.
- Desenvolver o modelo *in vitro* de dano a cardiomiócitos induzido por noradrenalina.
- Analisar vias de sinalização moduladas pelo extrato de mirtilo na sobrevivência/morte e no estado redox de cardiomiócitos na presença de noradrenalina.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

**Nota:** os métodos descritos abaixo incluem o protocolo experimental e as análises realizadas nos três estudos que compõem esta tese:

- **Estudo 1:** Extrato de mirtilo diminui o estresse oxidativo e melhora parâmetros funcionais em pulmões de ratos com hipertensão arterial pulmonar.
- **Estudo 2:** Extrato de mirtilo melhora o equilíbrio redox e parâmetros funcionais em ventrículo direito de ratos com hipertensão pulmonar.
- **Estudo 3:** Extrato de mirtilo atenua o estresse oxidativo e a apoptose induzidos por noradrenalina em células cardíacas H9c2.

Inicialmente, será apresentada a caracterização do extrato de mirtilo, abordada na seção 3.1: “Caracterização do extrato de mirtilo”, considerando-se que o mesmo extrato foi utilizado em todos os estudos. Os resultados da caracterização do extrato se encontram no Estudo 1.

Na sequência, serão apresentados os estudos 1 e 2, os quais compreendem trabalhos *in vivo* envolvendo técnicas de avaliação funcional e hemodinâmica, além de técnicas de análise bioquímica para avaliação do equilíbrio redox. Assim, ambos foram agrupados na metodologia, seção 3.2: “Estudos *in vivo*”.

Por último, será apresentado o estudo 3, o qual compreende um trabalho *in vitro* com cardiomiócitos, envolvendo técnicas de avaliação celular, como citometria e ensaios de morte/sobrevivência celular, além de técnicas de análise bioquímica para avaliação do equilíbrio redox. Dessa forma, este estudo é apresentado separadamente na seção 3.3: “Estudo *in vitro*”. Esse estudo foi desenvolvido em período sanduíche na Lakehead University, Canadá, sob supervisão da Profa. Dra. Neelam Khaper.

### **3.1 Caracterização do extrato de mirtilo**

O extrato de mirtilo foi adquirido da empresa Active Pharmaceutica - Brasil (extrato padronizado de mirtilo - *Vaccinium myrtillus*) e mantido refrigerado (4°C) e protegido da luz durante todo o período dos protocolos experimentais. Os perfis dos compostos antioxidantes (teor total de fenólicos, flavonóides totais e antocianidinas) no extrato foram analisados.

#### **3.1.1 Extração de compostos fenólicos para análise**

O extrato bruto foi ressuspenso em água Milli-Q (4,16 g/l) para análise de compostos fenólicos pela técnica de Folin-Ciocalteu e por HPLC (filtrado com membranas de nylon de 0,45 µm). Para a análise dos flavonóides totais, a mesma diluição foi feita, porém em etanol a 40%.

#### **3.1.2 Quantificação de fenóis totais por Folin-Ciocalteu**

O reagente de Folin-Ciocalteu foi utilizado para a quantificação dos compostos fenólicos. 0,5 ml da amostra foi adicionado a 2,5 ml de uma solução 10% de Folin-Ciocalteu e 2,0 ml de uma solução 7,5% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. O preparado foi agitado e incubado por 5 minutos a 50°C. O complexo azul formado foi quantificado a 760 nm em espectrofotômetro (ROESLER et al., 2007). A concentração fenólica foi estimada correlacionando a absorbância da amostra a uma curva padrão utilizando ácido gálico como padrão, e o resultado foi expresso em miligramas de equivalentes de ácido gálico/ grama extrato (mg EAG/g extrato).

#### **3.1.3 Quantificação de flavonóides totais**

Para quantificação dos flavonóides totais, foram utilizados 1 ml da amostra e 1 ml de uma solução 2% de AlCl<sub>3</sub>. O preparado foi agitado e incubado por 1h a 25°C. A quantificação de flavonóides foi realizada em um espectrofotômetro a 415 nm (MORESCO et al., 2014). A concentração de flavonóides foi estimada correlacionando a absorbância da amostra com uma curva padrão utilizando quercetina como padrão, e o resultado foi expresso em miligramas equivalentes de quercetina/grama de extrato (mg EQuerc/g de extrato).

### **3.1.4 Análise de compostos fenólicos por HPLC**

As análises de compostos fenólicos por HPLC foram realizadas no equipamento Agilent HP 1100 HPLC, coluna Lichrospher RP18 (5 µm), equipado com um detector de UV de 210 nm e sistema de bomba quaternária. A análise de fase reversa consistiu em água Milli-Q com ácido fosfórico a 1% (solvente A) e acetonitrila (solvente B). O sistema de bombeamento da fase móvel foi: 90% do solvente A de 0 a 5 min, 60% de A de 5 a 40 min e 90% de A de 45 a 50 min. O fluxo padrão foi mantido a 0,5 ml / min. As amostras foram filtradas em membranas de nylon de 0,45 µm. Os compostos fenólicos foram identificados de acordo com sua ordem de eluição e comparando seu tempo de retenção com padrões puros. A quantificação foi realizada pelo método de padronização externa, correlacionando a área do pico do composto com a curva padrão realizada com cada padrão (ácido gálico, epigallocatequina, catequina, epicatequina, galato de epigallocatequina, rutina, ácido ferúlico e resveratrol). Os resultados foram expressos em miligramas/grama de extrato.

### **3.1.5 Análise de antocianidinas por HPLC**

As análises de antocianidinas por HPLC foram realizadas nos equipamentos Waters 2690 e 996 HPLC, utilizando uma coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm x 3 µm) equipada com um detector PDA e um sistema de bomba binária. A análise de fase reversa consistiu em: solvente A - água Milli-Q com ácido trifluoroacético a 0,06% e solvente B - acetonitrila com ácido trifluoroacético a 0,06%. O sistema de bombeamento da fase móvel foi: 91% do solvente A de 0 a 4 min, 88% do solvente A de 4 a 6 min, 86% do solvente A de 6 a 18 min, 84% do solvente A de 18 a 24 min, 82% de solvente A de 24 a 26 min, 73% de solvente A de 26 a 50 min e 0% de solvente A de 50 a 55 min. O fluxo padrão foi mantido em 0,7 ml/min. Os compostos foram identificados de acordo com sua ordem de eluição e comparando seu tempo de retenção com padrões puros. A quantificação foi realizada pelo método de padronização externa, correlacionando a área do pico do composto com a curva padrão realizada com cada padrão (cianidina-3-O-glicosídeo, petunidina-3-O-glicosídeo, peonidina-3-O-glicosídeo e malvidina-3-O-glicosídeo). Os resultados foram expressos em g% de cada composto.

## 3.2 Estudos *in vivo*

### 3.2.1 Animais

Ratos Wistar (machos,  $200 \pm 20$  gramas) foram fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram alocados em caixas de polipropileno (340 x 200 x 410 mm) com três / quatro animais por gaiola. Os animais foram mantidos em condições padrão: temperatura (20–25 ° C), ciclos claro-escuro de 12 horas e umidade relativa de 70%. Água e ração comercial foram oferecidas *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as Diretrizes Internacionais para Uso e Cuidado de Animais de Laboratório e com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Os protocolos experimentais somente foram iniciados depois de terem sido aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA-UFRGS) (# 32192).

### 3.2.2 Protocolos experimentais

Foram utilizados 72 ratos Wistar (machos,  $200 \pm 20$  gramas) divididos nos seguintes grupos experimentais:

1) **Grupo Controle (CTR)** (n = 8): Animais que não tiveram indução da HAP e não receberam tratamento com extrato de mirtilo.

2) **Grupo Controle BB 50 mg/kg/dia (CTR BB50)** (n = 8): Animais que não tiveram indução da HAP e receberam tratamento com extrato de mirtilo na dose 50 mg/kg/dia durante 35 dias.

3) **Grupo Controle BB 100 mg/kg/dia (CTR BB100)** (n = 8): Animais que não tiveram indução da HAP e receberam tratamento com extrato de mirtilo na dose 100 mg/kg/dia durante 35 dias.

4) **Grupo Controle BB 200 mg/kg/dia (CTR BB200)** (n = 8): Animais que não tiveram indução da HAP e receberam tratamento com extrato de mirtilo na dose 200 mg/kg/dia durante 35 dias.

5) **Grupo Monocrotalina (MCT)** (n = 10): Animais que tiveram indução da HAP por injeção única de monocrotalina e não receberam tratamento com extrato de mirtilo.

6) **Grupo Monocrotalina BB 50 mg/kg/dia (MCT BB50)** (n = 10): Animais



que tiveram indução da HAP por injeção única de monocrotalina e receberam tratamento com extrato de mirtilo na dose 50 mg/kg/dia durante 35 dias.

7) **Grupo Monocrotalina BB 100 mg/kg/dia (MCT BB100)** (n = 10): Animais que tiveram indução da HAP por injeção única de monocrotalina e receberam tratamento com extrato de mirtilo na dose 100 mg/kg/dia durante 35 dias.

8) **Grupo Monocrotalina BB 200 mg/kg/dia (MCT BB200)** (n = 10): Animais que tiveram indução da HAP por injeção única de monocrotalina e receberam tratamento com extrato de mirtilo na dose 200 mg/kg/dia durante 35 dias.

**OBS:** Além disso, em um segundo momento, devido à escassez de tecido referente ao ventrículo direito, uma nova leva de animais foi solicitada para complementação de análises do equilíbrio redox (análises do imunoconteúdo de proteínas ligadas à homeostasia redox por Western Blot) tendo como objeto o fechamento do estudo 2. Nessa segunda leva, apenas 3 grupos (CTR - n = 9, MCT - n = 10 e MCT BB100 - n = 9) foram utilizados, tendo em vista a escolha da dose de 100 mg/kg/dia baseada nos resultados morfométricos, ecocardiográficos e hemodinâmicos previamente analisados.

O extrato de mirtilo foi solubilizado em água purificada em um sistema Milli-Q (Millipore Corporation, MA, EUA). As soluções de extrato foram preparadas diariamente e água ultra-pura foi usada como controle. O tratamento com extrato de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) foi realizado diariamente por cinco semanas (duas semanas antes da indução da HAP com monocrotalina e três semanas após a injeção de monocrotalina). As doses escolhidas foram baseadas em estudos que verificaram os efeitos do mirtilo sobre diferentes condições cardíacas utilizando outros modelos animais (AHMET et al., 2009; ELKS et al., 2001; LIU et al., 2015). O tratamento foi administrado por via oral pelo método da gavagem, respeitando o volume máximo de 1 ml de solução para cada 250 g de peso corporal. Os animais dos grupos que não receberam tratamento com extrato de mirtilo, receberam diariamente solução veículo (água ultra-pura), também por gavagem. Para a indução da hipertensão arterial pulmonar, os ratos dos grupos monocrotalina (MCT) receberam uma dose intraperitoneal única de 60 mg/kg de monocrotalina (Crotaline - C2401 Sigma Aldrich, MI, EUA). Os ratos dos grupos controle (CTR) receberam uma dose

única de solução salina intraperitoneal (NaCl a 0,9%). Ao final do protocolo experimental de 35 dias, o cateterismo do ventrículo direito foi realizado após ecocardiografia para avaliar a função cardíaca em animais anestesiados com cetamina (90 mg/kg, intraperitoneal) e xilazina (10 mg/kg, intraperitoneal) simultaneamente. Posteriormente, os animais foram eutanasiados sob efeito anestésico por decapitação manual de guilhotina em ambiente isolado. Finalmente, os pulmões (estudo 1) e o coração (estudo 3) foram coletados e mantidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  para realização das análises bioquímicas de avaliação do estado redox. Um esquema resumindo o protocolo experimental é mostrado na

### Grupos Experimentais

CTR + Veículo (água)	CTR + BB 50 mg/kg/dia	CTR + BB 100 mg/kg/dia	CTR + BB 200 mg/kg/dia	MCT + Veículo (água)	MCT + BB 50 mg/kg/dia	MCT + BB 100 mg/kg/dia	MCT + BB 200 mg/kg/dia
----------------------	-----------------------	------------------------	------------------------	----------------------	-----------------------	------------------------	------------------------

### Protocolo Experimental

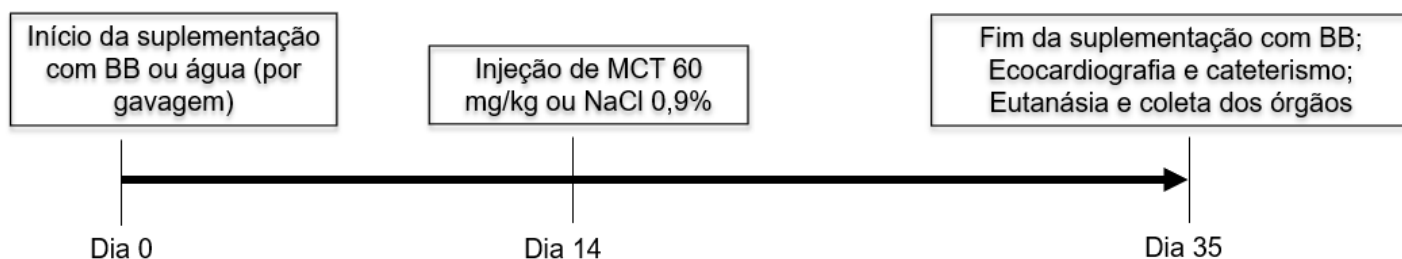


Figura 3.

**Figura 3:** Visão geral do protocolo experimental desenvolvido nos estudos *in vivo*.

### 3.2.3 Cálculo amostral

O cálculo do tamanho amostral foi efetuado utilizando-se o software G\*Power 3.1.9.2 (Schleswig-Holstein, Alemanha). No cálculo do tamanho da amostra foram considerados probabilidade de erro  $\alpha = 0,05$ , poder do teste estatístico = 0,80 e tamanho de efeito = 0,45. Considerando-se 8 grupos distintos de animais, o n calculado foi de 96 amostras no total. De acordo com a literatura, entre os animais tratados com monocrotalina a taxa de mortalidade varia em torno de 25% (SOUZA-RABBO et al. 2008), de forma que foram acrescentados 12 animais aos grupos monocrotalina (4 grupos), totalizando um n previsto de 108 animais.

### 3.2.4 Ecocardiografia

A ecocardiografia transtorácica é um excelente teste não invasivo para avaliar a função ventricular direita na HP (BOSSONE et al. 2013). A função diastólica do ventrículo direito foi avaliada em termos das velocidades diastólicas de pico precoce (E) e tardio (A) através da válvula tricúspide e sua relação (E/A) (OKUMURA et al., 2014). A função sistólica foi verificada utilizando como parâmetros a excursão sistólica do plano anular tricúspide (TAPSE) (FORFIA et al., 2006), a razão tempo de aceleração/tempo de ejeção (AT/ET) medida na saída do fluxo pela artéria pulmonar (KATO et al., 2003) e o cálculo do débito cardíaco do ventrículo direito, determinado usando a frequência cardíaca e o volume sistólico, o qual foi calculado de acordo com a área da seção transversal da artéria pulmonar na sístole e a integral de tempo/velocidade do fluxo através da artéria pulmonar (AUGUSTINE et al., 2018). Os animais foram anestesiados, submetidos à tricotomia da região torácica e posicionados em decúbito lateral. As imagens foram obtidas no modo bidimensional e no Doppler pulsado (Philips HD7 Ultrasound System), usando um transdutor S12-4 (Philips).

### **3.2.5. Cateterismo**

Os animais foram anestesiados, submetidos à tricotomia da região jugular direita e o campo cirúrgico foi desinfetado. A jugular foi dissecada e isolada. O fluxo sanguíneo foi bloqueado pelo uso de um oclisor de metal. Com o fluxo obstruído, foi feita uma incisão na parede superior do vaso para permitir a introdução de um cateter de polietileno (PE-50) preenchido com solução salina (NaCl a 0,9%). O cateter foi inserido no ventrículo direito e sua posição foi determinada pela observação da forma de onda característica da pressão ventricular. Imediatamente após esse registro inicial, seguido de 5 minutos de estabilização, foram registradas as pressões diastólica e sistólica do ventrículo direito. Os sinais de pressão analógicos foram digitalizados (Windaq-Data Acquisition System, PC) com uma taxa de amostragem de 1000 Hz, expressa em mmHg. Os valores das derivadas de contração (dP/dt máxima) e de relaxamento (dP/dt mínima) foram obtidos a partir da derivação da onda de pressão do ventrículo direito e da detecção de pontos máximos e mínimos para cada ciclo cardíaco. A seguinte fórmula foi utilizada para se estimar a pressão média da artéria pulmonar (MPAP):  $MPAP \text{ (mmHg)} = 0,61 \times \text{pressão sistólica do VD} + 2 \text{ mmHg}$  (KOSKENVUO et al., 2010).

### **3.2.6 Análises morfométricas do ventrículo direito**

Para análises de hipertrofia, o ventrículo direito foi pesado e a tíbia da pata traseira esquerda de cada animal retirada. O peso corporal dos animais foi determinado no dia da eutanásia. As seguintes razões foram usadas como indicadores de hipertrofia ventricular direita: massa do ventrículo direito/massa corporal, massa do ventrículo direito/ massa do ventrículo esquerdo e massa do ventrículo direito/comprimento da tíbia (YIN et al., 1982)

### **3.2.7 Preparação dos tecidos para análises do equilíbrio redox**

A homogeneização do pulmão (estudo 1) ou ventrículo direito (estudo 3) foi realizada por 40 segundos com o homogeneizador Ultra-Turrax (OMNI Tissue Homogenizer, OMNI International, EUA) na presença de 1,15% de KCl (5 ml/g de tecido) e 100 mM de fenilmetil sulfonil fluoreto. As amostras foram centrifugadas (20 minutos a 10000 x g a 4°C) e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 ° C até o início das análises. A quantificação de proteínas foi determinada conforme descrito pelo método de Lowry, usando solução de albumina de soro bovino como padrão (LOWRY et al., 1951).

### **3.2.8 Análises do equilíbrio redox**

#### **3.2.8.1 Espécies reativas totais**

A oxidação do composto DCFH-DA (diacetato de 2,7-diclorofluoresceína) à DCF (2,7-diclorofluoresceína) na presença das amostras foi usada para determinar o total de espécies reativas, como descrito por (LEBEL et al., 1992). Os resultados foram expressos como pmol de DCF/mg de proteína.

#### **3.2.8.2 Oxidação lipídica**

A oxidação lipídica foi avaliada pelo método de produção de quimioluminescência (QL) iniciada pela adição de hidróxido de terc-butil (TBOOH) às amostras, conforme descrito anteriormente (LLESUY et al., 1990). A QL foi medida em espectrômetro de cintilação líquida, 1215 LKB Wallac RackBeta (LKB Wallac, Austrália), operando como um luminômetro e com fototubos sensíveis à emissão na faixa de 380-620 nm. Os resultados foram

expressos como contagens por segundo (cps)/mg de proteína.

### **3.2.8.3 Atividade de NADPH oxidase**

A atividade da enzima NADPH oxidase foi determinada espectrofotometricamente (Espectrofotômetro UV Visível Cary 1E, Varian, CA, EUA), observando-se o consumo de NADPH a 340 nm por um intervalo de 10 minutos na presença das amostras, conforme Wei et al. (2006). Os resultados foram expressos em nmol NADPH/min/mg de proteína.

### **3.2.8.4 Nitritos totais**

A concentração de nitritos nas amostras foi medida usando o princípio da reação de Griess (GRANGER et al., 1999). A coloração final foi detectada espectrofotometricamente a 548 nm (Anthos Zenyth 200 RT, Biochrom, Reino Unido) e os resultados foram expressos em mM  $\text{NO}_2^-$ .

### **3.2.8.5 Conteúdo de carbonilas**

A quantificação de carbonilas foi baseada na reação de proteínas oxidadas com 2,4-dinitro-fenil-hidrazina em meio ácido, seguida de incubação com guanidina (REZNICK et al., 1994). A absorbância do derivado 2,4-dinitro-fenil-hidrazona foi medida em espectrofotômetro (Espectrofotômetro UV Visível Cary 1E, Varian, CA, EUA) a 360 nm. Os resultados foram expressos em mg/proteína.

### **3.2.8.6 Atividade da enzima superóxido dismutase**

A determinação da atividade da enzima superóxido dismutase foi baseada na inibição da reação do ânion radical superóxido com o composto pirogalol (MARKLUND e MARKLUND, 1974). Utilizou-se solução tampão (Tris-base 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,2), pirogalol 24 mM (em 10 mM de ácido clorídrico) e catalase 30  $\mu\text{M}$  na presença de amostra. Foi construída uma curva padrão com concentrações conhecidas de superóxido dismutase (superóxido dismutase de fígado bovino, pó liofilizado,  $\geq 1500$  unidades/mg proteína, Sigma-Aldrich, EUA). A atividade da superóxido dismutase pode ser determinada medindo a taxa de formação de pirogalol oxidado, o que leva à formação de um produto colorido detectado espectrofotometricamente a 420 nm (Espectrofotômetro UV Visível

Cary 1E, Varian, CA, EUA). Os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína.

### **3.2.8.7 Atividade da enzima catalase**

A atividade da enzima catalase foi medida através da avaliação do consumo de  $H_2O_2$ , conforme descrito anteriormente (BOVERIS e CHANCE, 1973). Os resultados foram expressos como nmol  $H_2O_2$  / min / mg de proteína.

### **3.2.8.8 Atividade da enzima glutathiona peroxidase**

A atividade da enzima glutathiona peroxidase foi medida avaliando-se a taxa de oxidação do NADPH a 340 nm na presença de glutathiona reduzida (GSH) e da enzima glutathiona redutase, usando-se azida ( $N_3Na$ ) para inibição da enzima catalase e hidroperóxido de tert-butil como iniciador da reação, conforme (MILLS, 1957). Os resultados foram expressos como nmol NADPH/min/mg de proteína.

### **3.2.8.9 Conteúdo de sulfidrilas**

O conteúdo de sulfidril representa uma defesa antioxidante não-enzimática que está inversamente correlacionada com o dano oxidativo às proteínas. Para esse ensaio, 0,1 mM de DTNB (ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)) foi adicionado a 15  $\mu$ l de amostra, com consequente incubação por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro, como descrito anteriormente (AKSENOV e MARKESBERY, 2001). A absorbância (formação do composto TNB - ácido 5-tiol-2-nitrobenzoico) foi medida em espectrofotômetro a 412 nm (Anthos Zenyth 200 RT, Biochrom, Reino Unido), e os resultados foram expressos como nmol TNB/mg de proteína.

### **3.2.9 Western blot**

Para os estudos *in vivo*, a dose de 100 mg/kg/dia foi escolhida para representar o grupo tratado com extrato de mirtilo para detecção do imunoc conteúdo de proteínas relacionadas ao equilíbrio redox. Essa escolha se baseou na melhora dos resultados morfométricos, funcionais e hemodinâmicos observada no grupo MCT BB100.

A eletroforese e a transferência de proteínas foram realizadas conforme

descrito por (LAEMMLI et al., 1970). Duzentos microgramas de proteína de homogeneizados pulmonares (estudo 1) ou de ventrículo direito (estudo 3) foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida monodimensional de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando um gel de separação de 8-12% (p/v). As proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) via eletroforese usando tampão Towbin modificado contendo 20 mM de Tris, 150 mM de glicina, 20% (v/v) de metanol, 0,02% (p/v) de SDS (pH 8,3) em uma unidade de transferência refrigerada. Posteriormente, os locais inespecíficos das membranas foram bloqueados por 1h de incubação em solução bloqueadora de leite desnatado a 5% (p/v) e tampão Tris-solução salina a 0,1% (p/v). A imunodeteção foi processada usando os seguintes anticorpos primários: anti-SOD1 (16kDa), anti-SOD2 (16 kDa), anti-xantina oxidase (150 kDa), anti-catalase (64 kDa), anti-gluthatione peroxidase 1/2 (23 kDa), anti-Nrf2 (57 kDa), anti-ETAR (69 kDa) e anti-ETBR (50 kDa) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Os anticorpos primários foram detectados usando anticorpos secundários conjugados com peroxidase, anti-coelho, anti-cabra e anti-camundongo; as membranas foram desenvolvidas usando reagentes de detecção de quimioluminescência. Os pesos moleculares das bandas foram determinados usando um marcador de peso molecular padrão (RPN 800 Bio-Rad, CA, EUA). Os resultados foram normalizados pelo método de Ponceau (KLEIN et al., 1995).

### **3.3 Estudo *in vitro***

#### **3.3.1 Reagentes**

O meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - High Glucose) e a noradrenalina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Soro bovino fetal (FBS), tripsina 0,05% e antibiótico-antimicótico (10.000 unidades/ml de penicilina, 10.000 µg/ml de estreptomicina, 25 µg/ml de Fungizona) foram adquiridos da Thermo Fisher (Waltham, MA, EUA). O extrato de mirtilo (BBE) (*Vaccinium myrtillus*) foi adquirido da Active Pharmaceutica (Palhoça, SC, Brasil), conforme descrito na seção 3.1

Os anticorpos primários utilizados nesse estudo foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EUA): coelho policlonal anti-Bax (1: 250);

da Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA): coelho policlonal anti-Caspase-3 (1:1000), coelho policlonal anti-fosfo-Akt (Ser473) (1:1000), coelho policlonal anti-Akt (1:500), camundongo policlonal anti-fosfo-STAT3 (Tyr705) (1:1000), coelho policlonal anti-STAT3 (1:1000), coelho monoclonal anti-fosfo-AMPK $\alpha$  (Thr172) (1:500), coelho monoclonal anti-AMPK $\alpha$  (1:1000), coelho policlonal anti-fosfo-FoxO3a (Ser253) (1:1000), coelho monoclonal anti-FoxO3a (1:500); da Abcam: coelho policlonal anti-catalase (1:1000), coelho policlonal anti-glutathione peroxidase 1 (1:500), coelho policlonal anti-NOX2/gp91phox (1:250); da Millipore: coelho policlonal anti-Mn-Superóxido Dismutase (1:1000). O anticorpo monoclonal secundário de camundongo anti- $\beta$ -Actina (1:5000) foi adquirido da Santa Cruz Biotechnology.

### 3.3.2 Cultivo celular e tratamentos

Células de mioblastos cardíacos de rato (H9c2) (American Type Culture Collection, VA, EUA) foram cultivadas em frascos de cultura de células T25 (25 cm<sup>2</sup> de superfície) e T75 (75 cm<sup>2</sup> de superfície) em DMEM suplementado com 10% de SFB e 1 % antibiótico-antimicótico e incubados a 37 °C na presença de 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade. O meio de cultura foi trocado a cada 2 a 3 dias e as células foram tripsinizadas e semeadas em novos frascos quando atingiram ~ 80% de confluência para manter as características das células cardíacas. Para os protocolos experimentais, as células foram semeadas a 1 x 10<sup>4</sup> células/poço de placa de 96 poços para o ensaio MTT para teste da viabilidade celular e 2 x 10<sup>5</sup> células/T-25 para análises por citometria de fluxo. Foi permitido às células sua aderência 24 horas antes dos experimentos.

Os seguintes grupos experimentais foram estabelecidos previamente aos experimentos descritos nas próximas seções:

1) **Controle** - células expostas ao meio de cultivo DMEM sem soro por 4h; meio alterado para DMEM sem soro por 24h;

2) **BBE** - células pré-tratadas com 50  $\mu$ g/ml de extrato de mirtilo diluído em DMEM sem soro por 4 horas; meio alterado para DMEM sem soro por 24h;

3) **NE** - células expostas ao DMEM sem soro por 4h; meio alterado para DMEM sem soro na presença de 100  $\mu$ M de noradrenalina por 24 horas;

4) **BBE + NE** - células pré-tratadas com 50  $\mu$ g/ml de extrato de mirtilo diluído em DMEM sem soro por 4 h; meio alterado para DMEM sem soro na



presença de 100  $\mu$ M de noradrenalina por 24 horas.

Essas concentrações foram escolhidas com base nos dados de viabilidade celular (ensaio MTT) e no ensaio de ativação de caspases 3/7 (CaspasTag, Chemicon, Temecula, CA, EUA).

### **3.3.3 Determinação da viabilidade celular**

A viabilidade das células H9c2 foi determinada pelo ensaio MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio]. As células foram semeadas em uma microplaca de 96 poços e após 20 h na presença ou ausência de 100 mM de noradrenalina, foi adicionada solução de MTT (10% v/v) a cada poço. As células foram incubadas a 37°C por 4 h, depois o meio foi removido e 50  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço. A microplaca foi colocada em agitador por 10 min no escuro e a viabilidade celular foi determinada medindo a absorbância a 490 nm (650 nm como referência) usando um leitor de microplacas (Powerwave XS, Biotek, Winooski, VT, EUA).

### **3.3.4 Análise de apoptose**

A apoptose foi determinada utilizando-se o kit CaspasTag Caspase-3/7 Assay (Chemicon, Temecula, CA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. As células positivas para caspase-3/7 foram avaliadas por citometria de fluxo (Becton Dickinson FACScalibur, BD Flow Cytometer, Franklin Lakes, NJ, EUA), com base na fluorescência na presença de inibidores de fluorocromos inibidores de caspase (FLICA) (DARZYNKIEWICZ et al., 2011). Os dados foram expressos como intensidade média de fluorescência.

### **3.3.5 Níveis de espécies reativas totais**

Os níveis totais de espécies reativas foram medidos utilizando-se o seguinte kit: H2DCFDA Assay (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Após 24 horas na presença ou ausência de 100 mM de noradrenalina, as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) e incubadas por 30 minutos com H2DCFDA, de acordo com as instruções do fabricante. O H2DCFDA foi então aspirado e as células foram lavadas novamente com PBS. As células foram então cuidadosamente removidas da placa de cultura por tripsinização e a fluorescência relativa das células foi medida por citometria de fluxo (Becton

Dickinson FACScalibur, BD Flow Cytometer, Franklin Lakes, NJ, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.3.6 Western blot

O imunoconteúdo de proteínas envolvidas em vias de sobrevivência e morte celular foi analisado por Western Blot. Células H9c2 cultivadas em frascos T75 mostrando confluência de ~ 80% após 24 h na presença ou ausência de noradrenalina foram tripsinizadas, colhidas e centrifugadas a 500 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com PBS duas vezes. 200 µL de tampão de lise (NaCl 150 mM, Tris 25 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, Triton X-100 a 1% (v v) e inibidores de protease (fluoreto de fenil metilsulfonil (PMSF), leupeptina, aprotinina e pepstatina) foram pipetados para lisar as células. Os detritos celulares foram removidos por centrifugação a 8 000xg por 10 minutos a 4°C, e o conteúdo de proteínas foi determinado pelo kit DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

Trinta µg de proteína de cada amostra foram fervidas e submetidas a eletroforese em gel (8 a 14%) de poliacrilamida monodimensional de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose usando o aparelho Bio-Rad Trans-Blot. As membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% em solução salina tamponada com Tris (TBS - 20 mM Tris, 137 mM NaCl) por 1 h em temperatura ambiente e depois incubadas com anticorpos primários durante a noite a 4° C. Os anticorpos primários foram removidos e as membranas foram lavadas 3 vezes com TBST por 5 minutos. As membranas foram incubadas com anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo conjugados com peroxidase de rabanete (HRP) durante 1 hora à temperatura ambiente. Finalmente, os anticorpos secundários foram removidos, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBST por 5 minutos e desenvolvidas usando reagente quimioluminescente. As imagens foram obtidas no programa QuantityOne utilizando-se o fotodocumentador Bio-Rad Gel Doc. Os dados foram expressos como média das densidades ópticas analisadas no software ImageJ 1.47t (Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, MD, EUA) normalizado pelo imunoconteúdo de  $\beta$ -actina.

## 3.4 Estatística

As médias e desvios-padrão foram calculados para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para se avaliar a distribuição paramétrica dos dados. Para dados com distribuição normal, as comparações foram feitas através de ANOVA de uma ou de duas-vias, complementado com o pós-teste de Tukey. O teste Kruskal-Wallis foi usado para comparação de dados não paramétricos, complementado com o pós-teste de Dunn. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística mostrou  $P < 0,05$ . O software GraphPad InStat 6.01 para Windows foi utilizado como ferramenta de análise.

#### 4. RESULTADOS

Os resultados obtidos na presente tese estão apresentados no formato de artigos. Para facilitar a organização e o entendimento, os resultados foram compilados e descritos em capítulos, como se segue:

**Capítulo I:** Extrato de mirtilo reduz o estresse oxidativo e melhora parâmetros funcionais nos pulmões de ratos com hipertensão arterial pulmonar.

**Original em inglês:** *Blueberry extract decreases oxidative stress and improves functional parameters in lungs m rats with pulmonary arterial hypertension.*

**Capítulo II:** Extrato de mirtilo melhora o equilíbrio redox e parâmetros funcionais no ventrículo direito de ratos com hipertensão arterial pulmonar.

**Original em inglês:** *Blueberry extract improves redox balance and functional parameters in the right ventricle from rats with pulmonary arterial hypertension.*

**Capítulo III:** Extrato de mirtilo atenua o estresse oxidativo e a apoptose induzidos por noradrenalina em células cardíacas H9c2.

**Original em inglês:** *Blueberry extract attenuates norepinephrine-induced oxidative stress and apoptosis of H9c2 cardiac cells.*

## CAPÍTULO I

### 4.1 Extrato de mirtilo reduz o estresse oxidativo e melhora parâmetros funcionais nos pulmões de ratos com hipertensão arterial pulmonar.

Neste capítulo reportamos a caracterização do extrato de mirtilo, com a análise dos principais compostos fenólicos presentes no extrato. Também verificamos os efeitos benéficos do extrato de mirtilo sobre os pulmões de animais com HAP induzida por monocrotalina, focando em aspectos funcionais e hemodinâmicos. Por fim, sugerimos que os mecanismos terapêuticos do extrato estejam relacionados com a melhora do estado redox no tecido pulmonar, culminando em melhoras no balanço vasoconstritores/vasodilatadores.

#### **Artigo original publicado:**

TÜRCK P. *et al.* Blueberry extract decreases oxidative stress and improves functional parameters in lungs m rats with pulmonary arterial hypertension. **Nutrition**, v. 70, 2020.

Manuscript Number: NUT-D-18-00398R1

Title: Blueberry extract decreases oxidative stress and improves functional parameters in lungs from rats with pulmonary arterial hypertension

Article Type: Original Article

Keywords: Blueberry; Pulmonary Hypertension; Oxidative Stress; Monocrotaline

Corresponding Author: Dr. Patrick Türck,

Corresponding Author's Institution: Federal University of Rio Grande do Sul

First Author: Patrick Türck

Order of Authors: Patrick Türck; Schauana F Fraga; Isadora S Salvador; Cristina Campos-Carraro; Denise S Lacerda; Alan C Bahr; Vanessa D Ortiz; Alexandre R Hickmann; Mariana Koetz; Adriane Belló-Klein; Amélia T, Henriques; Fabiana Agostini; Alex S Araujo

Abstract: BACKGROUND: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a condition characterized by an increased resistance of pulmonary vasculature, culminating in an increase in pulmonary pressure. This process involves disturbances in lung redox homeostasis, causing progressive right heart failure. In this context, the use of natural antioxidants, such as those found in blueberries, may represent a therapeutic approach. In our study, we evaluated the effect of blueberry extract (BB) on functional parameters and oxidative stress levels in rat lungs with induced PAH.

METHOD: Male Wistar rats (200 ± 20 g) (n = 48) were randomized into five groups: control (CTR), monocrotaline (MCT), monocrotaline + BB 50, monocrotaline + BB 100, and monocrotaline + BB 200. PAH was induced by the administration of monocrotaline (60 mg/kg, intraperitoneal). Rats were treated with BB at doses of 50, 100, and 200 mg/kg via gavage for five weeks (2 weeks before monocrotaline and 3 weeks after monocrotaline injection). At day 35, rats were submitted to echocardiography and catheterization, then euthanasia and lung harvesting for biochemical analyses.

RESULTS: BB increased the E/A ratio of blood flow across the tricuspid valve and TAPSE, as well as decreased the mean pulmonary artery pressure of animals compared to the PAH group. Moreover, BB decreased total reactive species concentration and lipid oxidation, reduced activity of NADPH oxidase and expression of xanthine oxidase, increased the activity of superoxide dismutase and restored sulfhydryl content in the animal lungs compared to those in the PAH group. In addition, BB restored expression of the antioxidant transcriptional factor Nrf2 in the lungs of the animal subjects. Finally, BB normalized the endothelin receptor (ETA/ETB) expression ratio in the animal lungs, which were increased in the PAH group.

CONCLUSION: Intervention with BB mitigated functional PAH outcomes through improvement of the pulmonary redox state. Our results provide a basis for future research on natural antioxidant interventions as a novel treatment strategy in PAH.

To **Alessandro Laviano, Dr.**

The Editor-in-chief of Nutrition

Dear Editor,

We are submitting to your appreciation a version of the manuscript entitled **“Blueberry extract improves oxidative stress and functional parameters in lungs from rats with pulmonary arterial hypertension”** for publication in the category of *Original Investigation* in Nutrition.

This research shows the protective effects of blueberry extract’s oral administration in rats with pulmonary arterial hypertension (PAH). Treatment with blueberry extract led to improvement of right ventricular echocardiographic and pulmonary arterial hemodynamic parameters affected by PAH. These results were attributed to a recovery of lung redox balance. Few studies are dedicated to investigating the extent to which antioxidants-rich food may improve PAH through the modulation of oxidative stress, which makes the search for nutritional alternatives that protect and preserve pulmonary function quite relevant. So far, there is no dietary approach in clinics regarding specifically PAH management. As far as we know, this is the first study demonstrating the potential effects of an antioxidants-rich food intervention (blueberries) on functional parameters and oxidative stress of lungs in a PAH model.

We state that this manuscript has not been published or submitted elsewhere and in case of its acceptance in Nutrition we will not publish it elsewhere without the consent of the copyright owners. We also state that the rights of third parties will not be violated, and that the publisher will not be held legally responsible if there is any claim of compensation related to this manuscript. All authors have made substantial contributions to this work and agreed to the final publication of this manuscript. The authors declare that there are no conflicts of interest. Thank you for considering our manuscript for publication in Nutrition.

Best regards,

**Patrick Türck, Msc.** (p.turck@gmail.com)



1 **Blueberry extract decreases oxidative stress and**  
2 **improves functional parameters in lungs from rats with**  
3 **pulmonary arterial hypertension**

4  
5 **Running Title: Blueberry extract in pulmonary arterial hypertension**

6  
7 Patrick Türck<sup>1\*§</sup>, Schauana Fraga<sup>1§</sup>, Isadora Salvador<sup>1</sup>, Cristina Campos-Carraro<sup>1</sup>, Denise  
8 Lacerda<sup>2</sup>, Alan Bahr<sup>1</sup>, Vanessa Ortiz<sup>1</sup>, Alexandre Hickmann<sup>1</sup>, Mariana Koetz<sup>3</sup>, Adriane  
9 Belló-Klein<sup>1</sup>, Amélia Henriques<sup>3</sup>, Fabiana Agostini<sup>4</sup>, Alex Sander da Rosa Araujo<sup>1,2</sup>

10  
11 § Both authors contributed equally to this work.

12  
13  
14  
15 <sup>1</sup> Department of Physiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio  
16 Grande do Sul (UFRGS), Brazil

17 <sup>2</sup> Postgraduate Program in Biological Sciences: Pharmacology and Therapeutics, Institute  
18 of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

19 <sup>3</sup> Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Pharmacy College, Federal  
20 University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

21 <sup>4</sup> Postgraduate Program at Biosciences and Rehabilitation, Centro Universitário  
22 Metodista-IPA, Porto Alegre, Brazil

23  
24  
25  
26 \* Corresponding author

27 Email address: p.turck@gmail.com (PT)

28  
29  
30  
31  
32

## 33 Abstract

34

35 **BACKGROUND:** Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a condition characterized  
36 by an increased resistance of pulmonary vasculature, culminating in an increase in  
37 pulmonary pressure. This process involves disturbances in lung redox homeostasis,  
38 causing progressive right heart failure. In this context, the use of natural antioxidants,  
39 such as those found in blueberries, may represent a therapeutic approach. In our study,  
40 we evaluated the effect of blueberry extract (BB) on functional parameters and oxidative  
41 stress levels in rat lungs with induced PAH.

42 **METHOD:** Male Wistar rats ( $200 \pm 20$  g) ( $n = 48$ ) were randomized into five groups:  
43 control (CTR), monocrotaline (MCT), monocrotaline + BB 50, monocrotaline + BB 100,  
44 and monocrotaline + BB 200. PAH was induced by the administration of monocrotaline  
45 (60 mg/kg, intraperitoneal). Rats were treated with BB at doses of 50, 100, and 200 mg/kg  
46 via gavage for five weeks (2 weeks before monocrotaline and 3 weeks after monocrotaline  
47 injection). At day 35, rats were submitted to echocardiography and catheterization, then  
48 euthanasia and lung harvesting for biochemical analyses.

49 **RESULTS:** BB increased the E/A ratio of blood flow across the tricuspid valve and  
50 TAPSE, as well as decreased the mean pulmonary artery pressure of animals compared  
51 to the PAH group. Moreover, BB decreased total reactive species concentration and lipid  
52 oxidation, reduced activity of NADPH oxidase and expression of xanthine oxidase,  
53 increased the activity of superoxide dismutase and restored sulfhydryl content in the  
54 animal lungs compared to those in the PAH group. In addition, BB restored expression  
55 of the antioxidant transcriptional factor Nrf2 in the lungs of the animal subjects. Finally,  
56 BB normalized the endothelin receptor (ETA/ETB) expression ratio in the animal lungs,  
57 which were increased in the PAH group.

58 **CONCLUSION:** Intervention with BB mitigated functional PAH outcomes through  
59 improvement of the pulmonary redox state. Our results provide a basis for future research  
60 on natural antioxidant interventions as a novel treatment strategy in PAH.

61

62 Keywords: Blueberry. Pulmonary Hypertension. Oxidative Stress. Monocrotaline.

63

## 64 **Introduction**

65

66 Pulmonary arterial hypertension (PAH) is described as a progressive disease that  
67 results from vascular disturbances and is characterized primarily by an increase in  
68 pulmonary vascular resistance and gradual lumen reduction, with a consequent elevation  
69 of pressure levels. In its final stage, there is dysfunction and failure of the right ventricle  
70 due to the increased afterload [1, 2]. Since PAH's pathophysiology is multifactorial, its  
71 precise pathogenic mechanism is unknown [3]. In this sense, it has been suggested that  
72 PAH is triggered by an initial inflammatory signal, leading to the overexpression of  
73 vasoconstrictor molecules and chronically impaired production of vasodilators, as well as  
74 promoting an increase in smooth muscle layer thickness in the pulmonary vessels [4–6].  
75 In addition to the imbalances between vasodilators and vasoconstrictors that were already  
76 mentioned, there is an important contribution by oxidative stress in PAH that may cause  
77 structural and functional damage to biomolecules [7].

78 One of the main free radicals discussed in this pathology is nitric oxide (NO). In  
79 general, there is a consensus that there is an impairment in signaling triggered by NO in  
80 PAH [8]. There are indications that the higher production of reactive oxygen species  
81 (ROS)—especially the superoxide radical anion ( $O_2^{\cdot-}$ )—may be increased in PAH as a  
82 consequence of a higher activation of NADPH oxidase and xanthine oxidase enzymes [9,  
83 10]. Increased  $O_2^{\cdot-}$  levels may diminish NO bioavailability;  $O_2^{\cdot-}$  reacts with NO and  
84 produces peroxynitrite ( $ONOO^-$ ), a strong oxidant that may provoke cellular damage [11].  
85 Therefore, a disruption of redox homeostasis may promote an increase in ROS,  
86 consumption of NO, and adverse remodeling of the lung vasculature, which is involved  
87 in the progression of PAH.

88 The vascular alterations can involve action from vasoactive peptides known as  
89 endothelins. There are three members of this family: ET1, ET2, and ET3. ET1, which is  
90 highly important, interacts with ETA and ETB receptors that are present in vascular  
91 endothelial cells and smooth muscle. The final result of ET1 activity is vasoconstriction;  
92 this physiological role, however, may change in pathological situations such as PAH. In  
93 PAH and similar pathologies, there is an imbalance of vasodilators (NO and prostacyclin)  
94 and vasoconstrictors ( $O_2^{\cdot-}$  and endothelin), providing increased vasoconstriction and  
95 pulmonary hypertension [12]. Both ETA and ETB receptors are involved in PSMCs  
96 proliferation in patients with PH [13]. However, since ETB has an important role in

97 mediating vascular relaxation through NO/PGI<sub>2</sub> release, it's inhibition could be  
98 detrimental. Dual antagonism of ETA/ETB or alternative specific ETA receptor  
99 inhibition as a strategy in PH treatment need further investigation [14].

100         Obtaining a more comprehensive understanding of the redox signaling pathways  
101 and the mechanisms of action of pro-oxidants and antioxidants is important for the  
102 development of therapeutic strategies for the prevention of cardiopulmonary diseases  
103 [15]. In this context, natural antioxidants have been used as treatments in diseases that  
104 involve increases in OS in their pathophysiology [16]. In particular, berries have high  
105 antioxidant content, including anthocyanins and phenolic compounds [17]. The blueberry  
106 (*Vaccinium spp.*) features one of the highest antioxidant capacities among fruits and  
107 vegetables tested to date [18]. Blueberries are great sources of anthocyanins [19], and  
108 several studies show that these activate cellular antioxidant systems and inhibit the  
109 expression of genes linked to pro-inflammatory proteins [20]. Evidence suggests that  
110 berries provide beneficial vascular effects—such as reducing blood pressure, improving  
111 oxidative parameters, and increasing vascular reactivity—by acting on multiple targets  
112 [18, 21].

113         Therefore, our hypothesis was based on the protective effect of blueberry extract  
114 on the lung tissue redox state to improve functional aspects through modulation of  
115 endothelin receptors in the vasculature of the lung in rats with monocrotaline-induced  
116 pulmonary arterial hypertension.

117

## 118 **Material and methods**

119

### 120 **Animals**

121

122         Male Wistar rats weighing  $200 \pm 20$  grams were provided from the Center for  
123 Reproduction and Experimentation of Laboratory Animals (CREAL) of the Federal  
124 University of Rio Grande do Sul (UFRGS). The animals were kept in polypropylene  
125 boxes (340 x 200 x 410 mm) with three or four animals per cage. All animals were  
126 maintained under standard environmental conditions: controlled temperature (20–25°C),  
127 light–dark cycles of 12 hours and relative humidity of 70%. Water and commercial feed  
128 were offered *ad libitum*. The animals were randomly assigned to the groups (n = 8–10  
129 animals per group), and weight gain was measured weekly.

130

## 131 **Ethical Considerations**

132

133 The project was referred to the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the  
134 Federal University of Rio Grande do Sul, and the experiments only started after its  
135 approval. All procedures in this study are in accordance with Law 11.794 and the  
136 Guidelines for the Care and Use of Animals for Scientific and Educational Purposes  
137 (DBCA) of National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). The  
138 number of the project approved by the University's CEUA is 32192. Functional analyses  
139 were performed with animals under ketamine (90 mg/kg, intraperitoneal) and xylazine  
140 (10 mg/kg, intraperitoneal) anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

141

## 142 **Blueberry Extract Characterization**

143 The blueberry extract was purchased from Active Pharmaceutica – Brazil  
144 (Bilberry – *Vaccinium myrtillus* L. Standardized Extract) and was kept refrigerated (4°C)  
145 and protected from light during the whole experimental protocol period. Antioxidant  
146 compound profiles (total phenolics, total flavonoids, and anthocyanidin content) in the  
147 extract were analyzed.

### 148 *Extraction of phenolic compounds*

149 The crude extracts were resuspended in Milli-Q water (4.16 g/L) for Folin-  
150 Ciocalteau analysis and for HPLC analysis (filtered with 0.45 µm Nylon membranes).  
151 For the analysis of total flavonoids, the same dilution was made but in 40% ethanol.

### 152 *Folin-Ciocalteau total phenolic analysis*

153 Folin-Ciocalteau reagent was used for the quantification of the phenolic  
154 compounds. One-half mL of the sample was added to 2.5 mL of 10% Folin-Ciocalteau  
155 and 2.0 mL of 7.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The tube was agitated and incubated for 5 minutes at 50°C.  
156 The blue complex formed was quantified at 760 nm in a spectrophotometer [22]. Phenolic  
157 concentration was estimated by correlating the absorbance of the samples to a standard  
158 curve made with gallic acid, and the result was expressed as milligrams of gallic acid  
159 equivalents/gram extract (mg EAG/g extract).

## 160 *Total flavonoids analysis*

161 To quantify total flavonoids, 1 mL of the sample and 1 mL of 2% aluminum  
162 chloride were used. The tube was stirred and incubated for 1 h at room temperature.  
163 Flavonoid quantification was measured in a spectrophotometer at 415 nm [23]. The  
164 concentration of flavonoids was estimated by correlating the absorbance of the samples  
165 to a standard curve performed with quercetin, in which the results were expressed as  
166 milligram equivalents of quercetin/gram extract (mg EQuerc/g extract).

## 167 *Analysis of phenolic compounds by HPLC*

168 The analyses were performed on Agilent HP 1100 HPLC equipment, Lichrospher  
169 RP18 column (5 µm) equipped with a 210 nm UV detector and quaternary pump system.  
170 The reverse phase analysis consisted of Milli-Q water with 1% phosphoric acid (solvent  
171 A) and acetonitrile (solvent B). The pumping system of the mobile phase was: 90% of  
172 solvent A from 0 to 5 min, 60% of A from 5 to 40 min, and 90% of A from 45 to 50 min.  
173 The standard flow was maintained at 0.5 mL/min. The samples were filtered on 0.45 µm  
174 nylon membranes. The phenolic compounds were identified according to their elution  
175 order and by comparing their retention time with pure standards. The quantification was  
176 performed by external standardization method, by correlating the area of the compound  
177 peak to the standard curve performed with each standard (gallic acid, epigallocatechin,  
178 catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, rutin, ferulic acid, and resveratrol). The  
179 results were expressed as milligrams/gram extract.

## 180 *Analysis of anthocyanidins by HPLC*

181 The analyses were performed on Waters 2690 and 996 HPLC equipment, a  
182 Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm x 3 µm) column equipped with a diode array  
183 detector (PDA), and a binary pump system. The reverse phase analysis consisted of:  
184 solvent A – Milli-Q water with TFA acid (0.06%) and solvent B – acetonitrile with TFA  
185 acid (0.06%). The pumping system of the mobile phase was: 91% of solvent A from 0 to  
186 4 min, 88% of solvent A from 4 to 6 min, 86% of solvent A from 6 to 18 min, 84% of  
187 solvent A from 18 to 24 min, 82% of solvent A from 24 to 26 min, 73% of solvent A from  
188 26 to 50 min, and 0% of solvent A from 50 to 55 min. The standard flow was maintained  
189 at 0.7 mL/min. The compounds were identified according to their elution order and by  
190 comparing their retention time with pure standards. The quantification was performed by

191 external standardization method by correlating the area of the compound peak to the  
192 standard curve performed with each standard (cyanidin 3-O-glucoside, petunidin 3-O-  
193 glucoside, peonidin-3-O-glucoside, and malvidin-3-O-glucoside). The results were  
194 expressed as g% of each compound.

## 195 **Experimental protocol and procedures**

196 For the experiments, the blueberry extract was solubilized in water purified in a  
197 Milli-Q system (Millipore Corporation, MA, EUA). The extract solutions were prepared  
198 daily, and ultra-pure water was used as the control. Treatment with blueberry (*Vaccinium*  
199 *myrtilus*) extract was performed daily for five weeks (two weeks pretreatment before the  
200 induction of PAH with monocrotaline and three weeks after monocrotaline injection).  
201 Three different doses were tested: 50, 100, and 200 mg/kg/day (MCT + BB50, MCT +  
202 BB100, and MCT + BB200 groups, respectively). Treatment was administered orally  
203 through the gavage method, respecting the maximum volume of 1 mL of solution for each  
204 250 g of body weight. Selected doses were based on studies that verified the effect of  
205 blueberry treatment on heart damage using different animal models [16, 17, 24, 25].

206 For the induction of pulmonary arterial hypertension, monocrotaline (MCT) rats  
207 received a single intraperitoneal dose of 60 mg/kg monocrotaline (Crotaline – C2401  
208 Sigma Aldrich, MI, EUA) [26]. Control rats (CTR) received a single dose of  
209 intraperitoneal saline solution (0.9% NaCl). The animals of the CTR and MCT groups  
210 received treatment with a water vehicle solution, also by gavage.

211 At the end of the 35-day protocol, right ventricular catheterization was performed  
212 after echocardiography to assess cardiac function in animals anesthetized with ketamine  
213 (90 mg/kg, intraperitoneal) and xylazine (10 mg/kg, intraperitoneal) simultaneously.  
214 Subsequently, the animals were euthanized under these anesthetic effects by manual  
215 guillotine decapitation in an isolated environment. Finally, the lungs were collected and  
216 kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until we performed redox state biochemical analyses.

## 217 **Echocardiography**

218 Transthoracic echocardiography is an excellent noninvasive test to evaluate right  
219 ventricular function in PH [27]. Diastolic right ventricular function can be assessed in  
220 terms of peak early (E) and late (A) diastolic velocities through tricuspid valve and their  
221 ratio (E/A) [28], while systolic function is commonly checked using the tricuspid annular  
222 plane systolic excursion (TAPSE) [29]. Animals were anesthetized, submitted to

223 trichotomy of the thoracic region, and placed in the lateral decubitus position. Images  
224 were obtained through two-dimensional mode and pulsed Doppler (Philips HD7  
225 Ultrasound System), using an S12-4 (Philips) transducer. E/A ratio of blood flow through  
226 the tricuspid and TAPSE were evaluated [30].

227

## 228 **Hemodynamic evaluation**

229

230 Animals were anesthetized, submitted to trichotomy of the right jugular region,  
231 and the surgical field was disinfected. The jugular was dissected and isolated. Blood flow  
232 was blocked by use of a metal occluder. With obstructed flow, an incision was made in  
233 the vessel's upper wall to allow the introduction of a polyethylene (PE-50) catheter filled  
234 with saline solution (0.9% NaCl). The catheter was inserted into the right ventricle, and  
235 its position was determined by the observation of the characteristic ventricular pressure  
236 waveform. Immediately after this initial recording, followed by 5 minutes of stabilization,  
237 right ventricular diastolic and systolic pressures were recorded. Analog pressure signals  
238 were digitized (Windaq-Data Acquisition System, PC) with a sampling rate of 1000 Hz,  
239 expressed in mmHg [31]. The following formula was used to estimate the mean  
240 pulmonary artery pressure (MPAP):  $MPAP \text{ (mmHg)} = 0.61 \times RV \text{ systolic pressure} + 2$   
241  $\text{mmHg}$  [32].

242

## 243 **Tissue preparation**

244

245 Lungs were immediately stored in liquid nitrogen after removal and stored at  
246  $-80^{\circ}\text{C}$  until analyses. Lung homogenization was performed for 40 seconds with Ultra-  
247 Turrax (OMNI Tissue Homogeneizer, OMNI International, USA) in the presence of  
248 1.15% KCl (5 mL/g tissue) and 100 mmol/L phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF).  
249 Then, the homogenates were centrifuged for 20 minutes at  $10000 \times g$  at  $4^{\circ}\text{C}$ . The  
250 supernatant was removed and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analyses of the redox state.  
251 Proteins were quantified using the method described by Lowry et al. [33].

252

## 253 **Redox Balance Analyses**

254

255 *Total reactive species*



256 Total reactive species quantification was based on the measurement of  
257 fluorescence produced by the oxidation of DCFH-DA (2,3-dichlorofluorescein diacetate)  
258 by reactive species present in the sample. A standard curve with known concentrations of  
259 DCF was used. Fluorescence was measured using excitation (480 nm) and emission (535  
260 nm) wavelengths (LS 55 Fluorescence Spectrometer, Perkin Elmer, MA, USA). Results  
261 were expressed as pmol of DCF/mg protein [34].

262

### 263 *Total nitrite content*

264

265 Nitrite concentration in samples was measured using the Griess reaction principle.  
266 Final staining was detected spectrophotometrically at 548 nm (Anthos Zenyth 200 RT,  
267 Biochrom, UK) and results were expressed in mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> [35].

268

### 269 *NADPH oxidase activity*

270

271 Activity of the NADPH oxidase enzyme was determined spectrophotometrically  
272 by observing the consumption of NADPH at 340 nm over a 10-minute interval (Cary 1E  
273 UV-Visible Spectrophotometer, Varian, CA, USA). For this assay, 25 µL of lung  
274 homogenate was used in the presence of 925 µL of 100 mM sodium phosphate buffer with  
275 50 µL of NADPH at 1 mg/mL (N1630 Sigma Aldrich, MI, EUA) [36]. Results were  
276 expressed as nmol NADPH/min/mg protein.

277

### 278 *Carbonyl content*

279

280 Carbonyl quantification was based on the reaction of oxidized proteins with 2,4-  
281 dinitro-phenyl hydrazine in acidic medium followed by incubation with guanidine.  
282 Absorbance of carbonyls was measured in a spectrophotometer (Cary 1E UV-Visible  
283 Spectrophotometer, Varian, CA, USA) at 360 nm. The results were expressed as  
284 mg/protein [37].

285

### 286 *Lipid oxidation*

287

288 Lipid oxidation was evaluated by the chemiluminescence (QL) production  
289 initiated by tert-butyl hydroxide (TBOOH) addition as described previously [38]. The QL  
290 was measured in a scintillation spectrometer (LKB Wallac RackBeta Liquid Scintillation  
291 Spectrometer 1215, Australia) operating as a luminometer and with emission sensitive  
292 phototubes in the range 380-620 nm. Results were expressed as counts cps/mg protein.

293

#### 294 *Superoxide dismutase activity*

295

296 Determination of superoxide dismutase (SOD) activity was based on the  
297 inhibition of the reaction of the superoxide radical anion with pyrogallol. Buffer solution  
298 (Tris-base 50 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 8.2), pyrogallol 24 mmol/L (in 10 mmol/L  
299 hydrochloric acid), and catalase 30  $\mu$ mol/L were used. A standard curve with known  
300 concentrations of SOD (from bovine, lyophilized powder,  $\geq 1500$  units/mg protein, Sigma  
301 Aldrich, MI, USA) was used. SOD activity can be determined by measuring the rate of  
302 oxidized pyrogallol formation, which leads to the formation of a colored product detected  
303 spectrophotometrically at 420 nm (Cary 1E UV-Visible Spectrophotometer, Varian, CA,  
304 USA). Results were expressed as U SOD/mg protein [39].

305

#### 306 *Catalase activity*

307

308 Catalase activity was measured through the evaluation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption, as  
309 reported previously [40]. Results were expressed as nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg protein.

310

#### 311 *Glutathione peroxidase (GPx) activity*

312

313 GPx activity was measured by evaluating the oxidation rate of NADPH at 340 nm  
314 in the presence of reduced glutathione (GSH) and glutathione reductase enzyme, using  
315 azide (N<sub>3</sub>Na) for inhibition of catalase and tert-butyl hydroperoxide as the reaction  
316 initiator [41]. Results were expressed as nmol NADPH/min/mg protein.

317

#### 318 *Sulfhydryl content*

319

320 Sulphydryl content represents a non-enzymatic antioxidant defense that is  
321 inversely correlated with oxidative damage to proteins. For the assay, 0.1 mM DTNB was  
322 added to 15  $\mu$ L of lung homogenates, which were incubated for 30 minutes at room  
323 temperature in the dark as previously described [42]. Absorbance (TNB formation) was  
324 measured spectrophotometrically at 412 nm (Anthos Zenyth 200 RT, Biochrom, UK),  
325 and results were expressed as nmol TNB/mg protein.

326

## 327 **Western Blot**

328

329 MCT + BB100 was selected to represent the treatment group, since 100mg/kg/day  
330 was dose that showed more pronounced functional improvements. Electrophoresis and  
331 protein transfer were performed as described by Laemmli [43]. Two hundred micrograms  
332 of protein from lung homogenates were subjected to sodium dodecyl sulfate (SDS-  
333 PAGE) monodimensional polyacrylamide gel electrophoresis in a batch system using an  
334 8-12% (w/v) separation gel. Separated proteins were transferred through membrane  
335 electrophoresis using modified Towbin buffer containing 20 mmol/L Tris, 150 mmol/L  
336 glycine, 20% (v/v) methanol, 0.02% (w/v) SDS (pH 8.3) in a cooled Bio-Rad transfer  
337 unit. Afterwards, nonspecific protein sites were blocked by 1 h incubation in 5% (w/v)  
338 blocking solution of skim milk and 0.1% (w/v) Tris-saline buffer. Immunodetection was  
339 processed using the following primary antibodies: anti- Cu/Zn-SOD (16 kDa) (Merck  
340 Milliore, Burlington, MA, USA); anti-xanthine oxidase (150 kDa), anti-catalase (64  
341 kDa), anti-Nrf2 (57 kDa), anti-ETAR (69 kDa), and anti-ETBR (50 kDa) (Santa Cruz  
342 Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Primary antibodies were detected using  
343 peroxidase-conjugated, anti-rabbit, and anti-goat secondary antibodies; the membranes  
344 were developed using chemiluminescent detection reagents. Molecular weights of the  
345 bands were determined using a standard molecular weight marker (RPN 800 rainbow full  
346 range Bio-Rad, CA, USA). Results were normalized by the Ponceau method [44].

347

## 348 **Statistics**

349

350 The means and standard deviations were calculated for each of the measures  
351 performed and for each of the groups studied. The Shapiro–Wilk test was used to  
352 determine parametric data. For data with normal distribution, the comparisons were made

353 through one-way ANOVA and complemented with the Tukey post-test. Kruskal-Wallis  
354 was used to compared non-parametric data, complemented Dunn's post-test. The  
355 differences were considered significant when statistical analysis showed  $P < 0.05$ .  
356 GraphPad InStat 6.01 for Windows was used as statistical analysis tool.

357

## 358 **Results**

359

### 360 **Antioxidant Compounds in Blueberry Extract**

361

362 Content of total phenolics, total flavonoids, and anthocyanidins present in the  
363 extract are described in Table 1.

364

### 365 **Effects of blueberry extract on functional parameters of PAH**

366

367 Regarding the functional parameters measured at day 35 of the experimental  
368 protocol, we observed that the tricuspid flow E/A ratio and TAPSE were reduced in the  
369 MCT group in comparison to the CTR group. On the other hand, all groups treated with  
370 the blueberry extract (MCT50, 100, and 200) were different from the CTR and MCT  
371 groups ( $*P < 0.0001$ ). Interestingly, animals treated with the 100 mg/kg dose (MCT +  
372 BB100) showed the closest results to the reestablishment of these parameters compared  
373 to the CTR group (Figure 1A and 1B). Regarding MPAP, all MCT groups showed a  
374 higher pressure compared to the CTR group. However, the MCT + BB100 group reduced  
375 this parameter compared to the MCT group ( $*P < 0.0001$ ), indicating an attenuation of  
376 MPAP as a consequence of treatment with blueberry extract (Figure 1C). Representative  
377 images of the E/A ratio, TAPSE and right ventricular pressures obtained to calculate  
378 MPAP for each group are available in the supplemental material (Supp. 1-3).

379

### 380 **Evaluation of reactive oxygen, nitrogen species, and** 381 **biomolecules oxidation**

382

383           There was an increase in the total reactive oxygen species in the MCT group when  
384 compared to the CTR group. On the other hand, all groups treated with blueberry extract  
385 were able to decrease this measure in comparison to the MCT group ( $*P = 0.0002$ ) (Figure  
386 2A). Regarding nitrite content, no differences were observed between groups ( $*P =$   
387  $0.9648$ ) (Figure 2B). When evaluating NADPH oxidase activity, there was an increase in  
388 the MCT group compared to the CTR group. However, all treated groups decreased  
389 NADPH oxidase activity in relation to the MCT group ( $*P = 0.0003$ ) (Figure 2C).  
390 Xanthine oxidase was more expressed in lungs of animals from MCT group compared to  
391 CTR group, an increase attenuated by 100 mg/kg/day blueberry extract treatment ( $*P =$   
392  $0.0008$ ) (Figure 2D). Regarding biomolecules damage, carbonyl content showed no  
393 differences between the groups ( $*P = 0.9161$ ) (Figure 2E). However, lipid damage was  
394 reduced in MCT + BB100 group compared to MCT group ( $*P = 0.0158$ ) (Figure 2F).

395

## 396 **Impact of treatment with blueberry extract on antioxidant** 397 **response**

398           Evaluating the redox state, all groups were different from the CTR group  
399 regarding SOD activity. However, the group treated with the dose of 100 mg/kg blueberry  
400 extract (MCT + BB100) was different compared to the MCT group ( $*P < 0.0001$ ),  
401 recovering SOD enzymatic activity. Despite the increased SOD activity in the MCT +  
402 BB100 group, protein expression of the Cu/Zn SOD enzyme did not appear to be  
403 increased ( $*P = 0.8808$ ) (Figure 3A). Both activity and expression of catalase were not  
404 different between the groups ( $*P = 0.4432$  and  $0.4929$ , respectively) (Figure 3B).  
405 Glutathione peroxidase activity was reduced in MCT and MCT +BB100 compared to  
406 CTR group ( $*P = 0.0021$ ) (Figure 3C). Concerning the sulfhydryl content, MCT and  
407 MCT + BB50 groups showed lower levels compared to the CTR ( $*P = 0.0008$ ). MCT +  
408 BB100 and MCT + BB200 were neither different from MCT group nor different from the  
409 CTR group, indicating the reestablishment of this antioxidant system in these treated  
410 groups (Figure 3D). The MCT group showed reduced Nrf2 expression in comparison to  
411 the CTR group ( $*P = 0.0021$ ). Treatment with blueberry extract with a dose of 100 mg/kg  
412 (MCT + BB100) was able to reestablish the expression of this factor in the lung tissue of  
413 the tested animals, and these results did not differ in relation to the CTR group (Figure  
414 3E).

415

## 416 **Blueberry extract reduces the ETA/ETB receptors ratio in** 417 **PAH**

418 MCT group showed increased ETA receptor protein expression, as well as the  
419 ETA/ETB ratio, in comparison to the CTR group (\* $P = 0.0021$ ). Treatment with blueberry  
420 extract at a dose of 100 mg/kg (MCT + BB100) was able to reestablish the expression of  
421 these factors in the lung tissue of animals and did not differ in relation to the CTR group  
422 (Figure 4).

423

## 424 **Discussion**

425

426 PAH is a syndrome that leads to an excessive increase in pulmonary pressure  
427 levels, inducing right ventricle remodeling and heart failure. An intervention is needed  
428 that can regulate and reduce this pressure to avoid severe cardiovascular consequences.  
429 In our study, we found a relative improvement in mean pulmonary artery pressure after  
430 administration of 100 mg/kg of blueberry extract along with a reduced ETA/ETB receptor  
431 ratio, which indicates that blueberry extract was able to alleviate vasoconstriction and  
432 pulmonary vascular remodeling after PAH. In addition, the reductions in the E/A ratio  
433 and TAPSE in MCT animals were attenuated in all treatment groups, suggesting  
434 blueberry extract's ability to partially improve flow through the tricuspid valve and right  
435 ventricular contractility during systole. This functional improvement has been associated  
436 with reduced ROS levels, NADPH oxidase activity, xanthine oxidase expression and lipid  
437 oxidation, as well as increased sulfhydryl levels and SOD activity; these characteristics  
438 demonstrate a blueberry-induced antioxidant response. Such a protective effect of the  
439 extract may be due, in part, to elevated Nrf2 levels. This treatment could stimulate an  
440 appropriate redox environment and diminished pathological vasoconstriction.

441 In the present study, we found a reduction in the E/A ratio and TAPSE in MCT  
442 animals. E/A ratio and TAPSE evaluation is an important measurement of right  
443 ventricular diastolic and systolic function, respectively, since both tend to decrease in  
444 PAH and are relevant indications of pathology. Cardiac dysfunction may be the  
445 consequence of adverse pulmonary vascular remodeling, which can promote increased  
446 lung arterial pressure that leads to increased right ventricular afterload. Indeed, results  
447 showed an increased mean pulmonary artery pressure in the MCT group. The ETA/ETB

448 receptor ratio was associated with increased pulmonary hypertension and was augmented  
449 in MCT animals, suggesting that vasoconstriction status affected by PAH is associated  
450 with a constrictive effect on vessels triggered by the endothelin–ETA receptor interaction.  
451 Zimmer et al. (2017) also demonstrated reduced ETB receptor protein expression in  
452 animals with PAH, which corroborates our data [45]. On the other hand, the decreased  
453 E/A ratio and TAPSE and increased mean pulmonary arterial levels were attenuated in  
454 all treated groups, suggesting a protective effect of blueberries on pulmonary vessels and  
455 the right ventricle. The blueberry treatment also reduced the ETA/ETB ratio, which  
456 reduced vascular tonus to a more relaxed status and further contributing to a diminished  
457 pulmonary pressure and the consequent effects on the right ventricle.

458 Endothelin-induced activation of the ETA receptor may provoke increase  
459 superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ) production that can induce vascular damage and lead to  
460 maladaptive vascular remodeling present in PAH [46]. In fact, our results demonstrate  
461 elevated ROS levels caused by PAH. Such ROS elevation is related to increased NADPH  
462 oxidase activity, which is a pro-oxidant enzyme involved in  $O_2^{\cdot-}$  production through the  
463 transfer of an electron from a donor molecule to oxygen; this mechanism is present in the  
464 cardiovascular system [47]. Vascular NADPH oxidases have been suggested to be  
465 capable of initiating the generation of ROS that may result in dysfunction and cellular  
466 death. Although no specific role has been assigned to each form of the enzyme, it has  
467 been established that both its expression and activity are regulated positively in the  
468 vasculature of hypertensive individuals; it has also been linked to the development of  
469 macro- and microvascular diseases [48]. Moreover, BB treatment decreased expression  
470 of xanthine oxidase, which is also involved in  $O_2^{\cdot-}$  production. Xanthine oxidase activity  
471 is increased in idiopathic PAH patients compared with healthy controls [49]. Therefore,  
472 it is important to reduce oxidases in order to reduce the oxidative stress of the tissue,  
473 particularly to attenuate the generation of  $O_2^{\cdot-}$ . In our study, we showed a decrease in  
474 NADPH oxidase activity and xanthine oxidase expression in the animals of treated  
475 groups, and this result can also be related to the reduction of total reactive oxidative  
476 species. Moreover, this finding is consistent with that found by other authors who used  
477 different extracts [50, 51].

478 Elevated ROS levels damage biomolecules, including proteins and lipids.  
479 Carbonyl content, an indicative of protein oxidation, was unchanged between the groups,  
480 while lipid oxidation was decreased in the lungs of treated animals. Patients with  
481 idiopathic PAH have a higher plasma protein carbonyl content compared to healthy

482 subjects [52]. The cause of unaltered carbonyl content in our study needs further  
483 investigation, but may be related to the experimental model and the time window we  
484 measured it (3 weeks after PAH induction). Morita et al (2017) reported distinct BB  
485 extracts capacity of lipid oxidation inhibition induced by several oxidants [53] and Spohr  
486 et al (2019) showed that BB extract prevented lipid oxidation initiated by ketamine in  
487 different organs from the neural system in rats [54]. Decreased lipid oxidation as an effect  
488 of the BB treatment in our study may have occurred as a consequence of reduced ROS  
489 and increased antioxidant defences. Since oxidized lipids participate in several  
490 pathophysiological processes of PAH, such as smooth muscle cell (SMC) proliferation,  
491 endothelial cell (EC) apoptosis, and inflammation [55], reduction in their oxidation is  
492 desired.

493         There was a relative improvement in the SOD activity in the treated group at the  
494 dose of 100 mg/kg. However, SOD expression appeared not to differ between the groups.  
495 SOD protein expression, in some cases, may not represent and coincide with its activity,  
496 since the SOD protein can suffer oxidation of its amino acids in situations with high levels  
497 of ROS, resulting in changes in its activity but not in its expression [56]. A recent study  
498 used anthocyanin-enriched blueberry extract to evaluate the activity of SOD in  
499 cyclophosphamide-induced lung injuries in rats [51]. This study showed an improvement  
500 in the activity of this enzyme in animals treated with the extract, similar to the results of  
501 our work in the animals treated with the dose of 100 mg/kg; these findings suggest the  
502 important antioxidant potential presented by blueberries. Interestingly, another study on  
503 pulmonary toxicity evaluated treatment with the extract of a berry fruit, *Carissa opaca*,  
504 which restored SOD activity in the lungs of treated animals [57]. SOD is a very important  
505 antioxidant enzyme that may remove  $O_2^{\cdot-}$ , avoiding chain reactions and subsequent  
506 biomolecular damage [58]. Because of the fundamental role of SOD in modulating the  
507 concentration of  $O_2^{\cdot-}$  in the vasculature, impairment of this enzyme has been associated  
508 with pathological conditions involving vascular dysfunction, such as diabetes and  
509 hypertension. It is believed that oxidative stress—especially when caused by the  
510 production of  $O_2^{\cdot-}$ —induces endothelial dysfunction. In addition, excess  $O_2^{\cdot-}$  can directly  
511 antagonize the actions of nitric oxide (NO) by a direct chemical interaction. Endothelium-  
512 derived NO controls the extent of vascular smooth muscle relaxation, inhibits platelet  
513 aggregation, and attenuates neutrophil adhesion to the endothelium. SOD opposes the  
514 inactivation of vascular NO; thus, it may be crucial for the maintenance of blood vessel  
515 tonus [59].



516 NO is also a free radical and is able to diffuse freely. It has limited action because  
517 of its short half-life. It is important to note that the deleterious radical from NO is  
518 peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), which is a result of the reaction of NO with O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Peroxynitrite is  
519 a powerful oxidant for all types of molecules and is therefore highly cytotoxic. ONOO<sup>-</sup> is  
520 unstable and can be converted into new active species, such as the hydroxyl radical (<sup>•</sup>OH),  
521 which does not have an antioxidant system capable of neutralizing it [46]. NO is also an  
522 important signaling molecule that modulates various physiological processes [59].  
523 Although our work did not show differences in total nitrite concentrations between the  
524 experimental groups, we suggest that there is a lower probability of peroxynitrite  
525 formation in the treated groups because we observed a decrease of total reactive species  
526 in all groups that received the blueberry extract. Thus, there may be a higher availability  
527 of NO in the lung tissue of these animals. As discussed earlier, SOD assists in controlling  
528 the level of O<sub>2</sub><sup>-</sup> available to react with NO and contributes to preserving the physiological  
529 functions of this molecule [59].

530 The imbalance between increased levels of ROS and reactive nitrogen species  
531 (RNS) associated with a low activity of antioxidant mechanisms determines oxidative  
532 stress status. In this way, the enhancement of antioxidant mechanisms for the maintenance  
533 of cellular integrity is of prime importance. Catalase and glutathione peroxidase are  
534 fundamental enzymes in maintaining cellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> under appropriate levels. Particularly,  
535 glutathione peroxidase can also act on peroxides other than H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, such as fatty acid  
536 hydroperoxides, promoting their reduction. This event seems to be relevant in PAH, once,  
537 as described previously, lipid oxidation is a hallmark of the pathology. In fact, glutathione  
538 peroxidase activity is decreased in lungs of idiopathic PAH patients, and this reduction is  
539 associated with alterations in NO and PAP [60]. Accordingly, we found decreased  
540 glutathione peroxidase activity in MCT animals, a decline that BB treatment was not able  
541 to rescue. A plausible interpretation for that is the fact that modulation of other antioxidant  
542 enzymes by the extract, such as increased SOD and decreased NADPH and xanthine  
543 oxidases, may have contributed to a less oxidative status of the cellular environment, in  
544 which glutathione peroxidase reestablishment was not necessary to improve redox state.  
545 Sulfhydryl compounds are sensitive to changes in the concentration of free radicals  
546 because the free -SH groups can be oxidized in the presence of oxidative stress. Thus,  
547 they are used as indicators of non-enzymatic antioxidant activity, and they are  
548 characterized as a barrier to oxidative stress [61]. In the present study, we verified the

549 restoration of sulfhydryl content in groups treated with 100 and 200 mg/kg doses of  
550 blueberry extract, indicating a reestablishment of the antioxidant capacity in the lungs of  
551 treated animals similar to the results found by other authors in therapy with potential  
552 antioxidants in different tissues [50, 62].

553         Antioxidant response can be regulated by activation of the transcriptional factor  
554 Nrf2, which plays a central role in redox response. Its activation basically occurs because  
555 of its separation from Keap and translocation to the cell nucleus; this culminates in the  
556 transcription of the genes of several enzymes with antioxidant properties [63]. The  
557 capacity of natural antioxidant compounds for activating the Nrf2 pathway has been  
558 reported, and these compounds have resulted in the repair of the redox balance in several  
559 disorders [64]. Our work showed that blueberry extract (100 mg/kg dose) was able to  
560 restore the expression of this factor in the lung tissue of treated animals, and we showed  
561 that blueberry supplementation contributes both to the decrease of ROS and to the  
562 improvement of antioxidant signaling to result in an improved redox balance.

563         Eventually with this study, it was possible to observe that, within the lungs after  
564 PAH, there is the presence of an imbalance in redox homeostasis that is associated with  
565 functional losses. Structural changes in pulmonary arteries observed in MCT-induced  
566 pulmonary hypertension are similar to the characteristics of human pulmonary  
567 hypertension at marked medial wall thickening levels [65]. Thus, the use of animal  
568 models contributes extensively to a better understanding of PAH and helps in the study  
569 of novel therapies. The blueberry extract was able to reverse oxidative damage in the  
570 lungs, possibly in the lungs' vasculature, and we attribute these effects mainly to the use  
571 of the 100 mg/kg dose that modulates enzymes that participate in the metabolism of nitric  
572 oxide and leads to vascular improvement and resumption of the redox balance.

573

## 574 **Conclusion**

575

576         We conclude that blueberry extract, especially at the dose of 100 mg/kg, was able  
577 to attenuate vascular and oxidative alterations caused by PAH. The improvement in the  
578 redox balance seems to be associated with the extract's ability to enhance right ventricular  
579 function. Therefore, the regular consumption of foods rich in antioxidants, such as  
580 blueberries, may be an alternative or adjuvant therapy to the classical treatment for the

581 attenuation or prevention of the development of diseases that compromise redox  
582 homeostasis, as we have shown for PAH.

583

## 584 **Acknowledgments**

585

586 Authors thank the colleagues from Department of Physiology – Federal University  
587 of Rio Grande do Sul – Dr. Wania Aparecida Partata and Dr. Maria Flavia Marques  
588 Ribeiro who kindly assisted the research with their technical help.

589

## 590 **Financial Support**

591

592 This work received financial support from the following Brazilian development  
593 agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and  
594 Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

595

## 596 **Conflicts of interest**

597

598 The authors declare no conflicts of interest.

599

## 600 **References**

601

602 [1] E.D. Austin, T. Lahm, J. West, S.P. Tofovic, A.K. Johansen, M.R. Maclean, A.  
603 Alzoubi, M. Oka, Gender, sex hormones and pulmonary hypertension., *Pulm. Circ.* 3  
604 (2013) 294-314.

605 [2] M.M. Hoeper, H.J. Bogaard, R. Condliffe, R. Frantz, D. Khanna, M. Kurzyna, D.  
606 Langleben, A. Manes, T. Satoh, F. Torres, M.R. Wilkins, D.B. Badesch, Definitions and  
607 diagnosis of pulmonary hypertension, *J. Am. Coll. Cardiol.* 62 (2013) D42-D50.

608 [3] M. Rabinovitch, Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension, *J. Clin.*  
609 *Invest.* 118 (2008) 2372-2379.

610 [4] J.K. Liao, Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation, *J. Clin.*  
611 *Invest.* 123 (2013) 540-541.

- 612 [5] M. Vaillancourt, G. Ruffenach, J. Meloche, S. Bonnet, Adaptation and remodelling  
613 of the pulmonary circulation in pulmonary hypertension, *Can. J. Cardiol.* 4 (2015) 407-  
614 415.
- 615 [6] A.C. Newby, Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death  
616 of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates,  
617 *Cardiovasc. Res.* 69 (2006) 614-624.
- 618 [7] H. Tsutsui, S. Kinugawa, S. Matsushima, Mitochondrial oxidative stress and  
619 dysfunction in myocardial remodelling, *Cardiovasc. Res.* 81 (2009) 449-456.
- 620 [8] D.M. Tabima, S. Frizzell, M.T. Gladwin, Reactive oxygen and nitrogen species in  
621 pulmonary hypertension, *Free Radic. Biol.* 9 (2012) 1970-1986.
- 622 [9] V.G. DeMarco, J. Habibi, A.T. Whaley-Connell, R.I. Schneider, R.L. Heller, J.P.  
623 Bosanquet, M.R. Hayden, K. Delcour, S.A. Cooper, B.T. Andresen, J.R. Sowers, K.C.  
624 Dellsperger, Oxidative stress contributes to pulmonary hypertension in the transgenic  
625 (mRen2)27 rat, *Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol.* 294 (2008) H2659-H2668.
- 626 [10] R.E. Nisbet, J.M. Bland, D.J. Kleinhenz, P.O. Mitchell, E.R. Walp, R.L. Sutliff, C.M.  
627 Hart, Rosiglitazone attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in a  
628 mouse model, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42 (2010) 482-490.
- 629 [11] P. Pacher, J. Beckman, L. Liaudet, Nitric oxide and peroxynitrite in health and  
630 disease, *Physiol. Rev.* 87 (2007) 315-424.
- 631 [12] M.Q. Mazzuca, R.A. Khalil, Vascular endothelin receptor type B: structure, function  
632 and dysregulation in vascular disease, *Biochem. Pharm.* 84 (2012) 147-162.
- 633 [13] N. Davie, S.J. Haleen, P.D. Upton, J.M. Polak, M.H. Yacoub, N.W. Morrell, J.  
634 Wharton, ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary  
635 artery smooth muscle cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165 (2002) 398-405.
- 636 [14] J. Pepke-Zaba, N.W. Morrell, The endothelin system and its role in pulmonary  
637 arterial hypertension (PAH). *Thorax.* 60 (2005) 443-4.
- 638 [15] D. Trachootham, W. Lu, M.A. Ogasawara, N.R.-D. Valle, P. Huang, Redox  
639 regulation of cell survival, *Antioxid. Redox Signal.* 10 (2008) 1343-1374.
- 640 [16] I. Ahmet, E. Spangler, B. Shukitt-Hale, M. Juhaszova, S.J. Sollott, J.A. Joseph, D.K.  
641 Ingram, M. Talan, Blueberry-enriched diet protects rat heart from ischemic damage,  
642 *PLoS One.* 4 (2009) 1-10.
- 643 [17] C.M. Elks, S.D. Reed, N. Mariappan, B. Shukitt-Hale, J.A. Joseph, D.K. Ingram, J.  
644 Francis, A blueberry-enriched diet attenuates nephropathy in a rat model of hypertension  
645 via reduction in oxidative stress, *PLoS One.* 6 (2011) 4-13.
- 646 [18] C.N. Zhao, X. Meng, Y. Li, S. Li, Q. Liu, G.Y. Tang, H.B. Li, Fruits for prevention  
647 and treatment of cardiovascular diseases, *Nutrients.* 9 (2017) E598.

- 648 [19] Š. Može, T. Polak, L. Gašperlin, D. Koron, A. Vanzo, N. Poklar Ulrih, V. Abram,  
649 Phenolics in slovenian bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberries (*Vaccinium*  
650 *corymbosum* L.), *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 6998-7004.
- 651 [20] S. Zafra-Stone, T. Yasmin, M. Bagchi, A. Chatterjee, J.A. Vinson, D. Bagchi, Berry  
652 anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention, *Mol. Nutr.*  
653 *Food Res.* 51 (2007) 675-683.
- 654 [21] B.R. Cutler, C. Petersen, P.V.A. Babu, Mechanistic insights into the vascular effects  
655 of blueberries: evidence from recent studies, *Mol. Nutr. Food Res.* 61 (2016) 1-35.
- 656 [22] R. Roesler, L.G. Malta, L.C. Carrasco, R.B. Holanda, C.A.S Sousa, G.M. Pastore,  
657 Antioxidant activity of cerrado fruits, *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 27 (2007) 53-60.
- 658 [23] H.H. Moresco, M. Pereira, L.C. Bretanha, G.A. Micke, M.G. Pizzolatti, I.M.C.  
659 Brighente, Myricitrin as the main constituent of two species of *Myrcia*, *J. Appl. Pharm.*  
660 *Sci.* 4 (2014) 1-7.
- 661 [24] O.M. Ashour, A.A. Elberry, A. Alahdal, A.M. Al Mohamadi, A.A. Nagy, A.B.  
662 Abdel-Naim, E.A. Abdel-Sattar, A.M. Mohamadin, Protective effect of bilberry  
663 (*Vaccinium myrtillus*) against doxorubicin-induced oxidative cardiotoxicity in rats., *Med.*  
664 *Sci. Monit.* 17 (2011) BR110-R115.
- 665 [25] Y. Liu, D. Tan, L. Shi, X. Liu, Y. Zhang, C. Tong, D. Song, M. Hou, Blueberry  
666 anthocyanins-enriched extracts attenuate cyclophosphamide-induced cardiac injury,  
667 *PLoS One.* 10 (2015) 1-18.
- 668 [26] P.K. Singal, N. Khaper, F. Farahmand, A. Belló-Klein, Oxidative stress in congestive  
669 heart failure., *Curr. Cardiol. Rep.* 2 (2000) 206-11.
- 670 [27] E. Bossone, A. D'Andrea, M. D'Alto, R. Citro, P. Argiento, F. Ferrara, A. Cittadini,  
671 M. Rubenfire, R. Naeije, Echocardiography in pulmonary arterial hypertension: from  
672 diagnosis to prognosis. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 26 (2013) 1-14.
- 673 [28] K. Okumura, C. Slorach, D. Mroczek, A. Dragulescu, L. Mertens, A.N. Redington,  
674 M.K. Friedberg, Right ventricular diastolic performance in children with pulmonary  
675 arterial hypertension associated with congenital heart disease: correlation of  
676 echocardiographic parameters with invasive reference standards by high-fidelity  
677 micromanometer catheter. *Circ. Cardiovasc. Imaging.* 7 (2014) 491-501.
- 678 [29] P.R. Forfia, M.R. Fisher, S.C. Mathai, T. Houston-Harris, A.R. Hemnes, B.A.  
679 Borlaug, E. Chamara, M.C. Corretti, H.C. Champion, T.P. Abraham, R.E. Girgis, P.M.  
680 Hassoun, Tricuspid annular displacement predicts survival in pulmonary hypertension.  
681 *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174 (2006) 1034-41.
- 682 [30] L.G. Rudski, W.W. Lai, J. Afilalo, L. Hua, M.D. Handschumacher, K.  
683 Chandrasekaran, S.D. Solomon, E.K. Louie, N.B. Schiller, Guidelines for the  
684 Echocardiographic Assessment of the Right Heart in Adults: A Report from the American

685 Society of Echocardiography endorsed by the European Association of  
686 Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology and the  
687 Canadian Society of Echocardiography, *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 23 (2010) 685-713.

688 [31] A.R.L. Ludke, F. Mosele, R. Caron-Lienert, M.F. Ribeiro, W. Partata, S. Llesuy,  
689 A.S. Araujo, P. Singal, A. Belló-Klein, Modulation of monocrotaline-induced cor  
690 pulmonale by grape juice, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 55 (2010) 89-95.

691 [32] J.W. Koskenvuo, R. Mirsky, Y. Zhang, F.S. Angeli, S. Jahn, T.-P. Alastalo, N.B.  
692 Schiller, A.J. Boyle, K. Chatterjee, T. De Marco, Y. Yeghiazarians, A comparison of  
693 echocardiography to invasive measurement in the evaluation of pulmonary arterial  
694 hypertension in a rat model, *Int. J. Cardiovasc. Imaging.* 26 (2010) 509-518.

695 [33] O. Lowry, N. Rosebrough, L. Farr, R. Randall, Protein measurement with the Folin  
696 phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.

697 [34] C.P. Lebel, H. Ischiropoulos, S.C. Bondy, Evaluation of the Probe 2',7'-  
698 Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative  
699 Stress, *Chem. Res. Toxicol.* 5 (1992) 227-231.

700 [35] D.L. Granger, N.M. Anstey, W.C. Miller, J.B. Weinberg, Measuring nitric oxide  
701 production in human clinical studies. *Methods Enzymol* 301 (1999) 49-61.

702 [36] Y. Wei, J.R. Sowers, R. Nistala, H. Gong, G.M. Uptergrove, S.E. Clark, E.M. Morris,  
703 N. Szary, C. Manrique, C.S. Stump, Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation  
704 impairs insulin signaling in skeletal muscle cells, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 35137-35146.

705 [37] A.Z. Reznick, L. Packer, Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method  
706 for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 233 (1994) 357-63.

707 [38] S.F. Llesuy, J. Milei, B.S. Gonzalez Flecha, A. Boveris, Myocardial damage induced  
708 by doxorubicins: hydroperoxide-initiated chemiluminescence and morphology. *Free*  
709 *Radic. Biol. Med.* 8 (1990) 259-64.

710 [39] S. Marklund, G. Marklund, Involvement of the superoxide anion radical in the  
711 autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *Eur. J.*  
712 *Biochem.* 47 (1974) 469-474.

713 [40] A. Boveris, B. Chance, The mitochondrial generation of hydrogen peroxide, General  
714 properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134 (1973) 707-16.

715 [41] G.C. Mills, Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte  
716 enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 229 (1957)  
717 189-97.

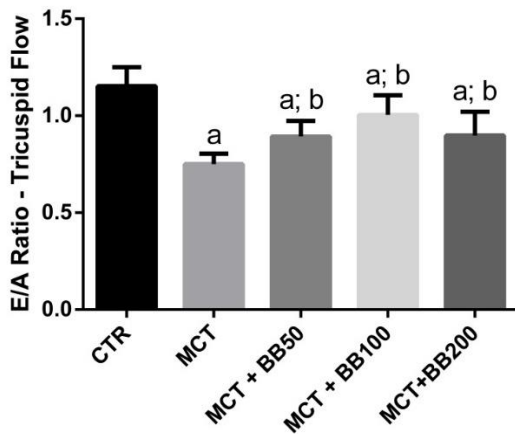
718 [42] M.Y. Aksenov, W.R. Markesbery, Changes in thiol content and expression of  
719 glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's  
720 disease. *Neurosci. Lett.* 302 (2001) 141-5.

- 721 [43] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of  
722 bacteriophage T4, *Nature*. 227 (1970) 680-685.
- 723 [44] D. Klein, R.M. Kern, R.Z. Sokol, A method for quantification and correction of  
724 proteins after transfer to immobilization membranes, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 36 (1995)  
725 59-66.
- 726 [45] A. Zimmer, R.B Teixeira, J.H. Bonetto, R. Siqueira, C.C. Carraro, L.M. Donatti, A.  
727 Hickmann, I.E. Litvin, A.E. Godoy, A.S Araujo, R. Colombo, A. Belló-Klein. Effects of  
728 aerobic exercise training on metabolism of nitric oxide and endothelin-1 in lung  
729 parenchyma of rats with pulmonary arterial hypertension. *Mol. Cell. Biochem.* 429  
730 (2017) 73-89.
- 731 [46] J.C. Preiser, Oxidative Stress, *J Parenter. Enteral. Nutr.* 36 (2012) 147-154.
- 732 [47] A.M. Pisoschi, A. Pop, The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress:  
733 A review, *Eur. J. Med. Chem.* 97 (2015) 55-74.
- 734 [48] D.S Lacerda, P. Türck, B.G. de Lima-Seolin, R. Colombo, V.D. Ortiz, J.H. Bonetto,  
735 C. Campos-Carraro, S.E. Bianchi, A. Belló-Klein, V.L. Bassani, A.S.R Araujo,  
736 Pterostilbene reduces oxidative stress, prevents hypertrophy and preserves systolic  
737 function of right ventricle in cor pulmonale model, *Br. J. Pharmacol.* 174 (2017) 3302-  
738 3314.
- 739 [49] S. Spiekermann, K. Schenk, M.M. Hoepfer, Increased xanthine oxidase activity in  
740 idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* 34 (2009) 276-283.
- 741 [50] T. Ramesh, V.H. Begum, Protective Effect of *Sesbania grandiflora* against cigarette  
742 smoke-induced oxidative damage in rats, *J. Med. Food.* 11 (2008) 369-375.
- 743 [51] D. Tan, Y. Liu, L. Shi, B. Li, L. Liu, B. Bai, X. Meng, M. Hou, X. Liu, L. Sheng,  
744 X. Luo, Blueberry anthocyanins-enriched extracts attenuate the cyclophosphamide-  
745 induced lung toxicity, *Chem. Biol. Interact.* 222 (2014) 106-111.
- 746 [52] C.M. Wong, G. Bansal, L. Pavlickova, L. Marcocci, Y.J. Suzuki, Reactive oxygen  
747 species and antioxidants in pulmonary hypertension. *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2013)  
748 1789-96.
- 749 [53] M. Morita, Y. Naito, T. Yoshikawa, E. Niki, Antioxidant capacity of blueberry  
750 extracts: Peroxyl radical scavenging and inhibition of plasma lipid oxidation induced by  
751 multiple oxidants. *Journal of Berry Research* 7 (2017) 1-9.
- 752 [54] L. Spohr, M.S.P. Soares, P.S. Oliveira, B. da Silveira de Mattos, N.P. Bona, N.S.  
753 Pedra, F.C. Teixeira, C.A.T. do Couto, V.C Chaves, F.H. Reginatto, M.T. Lisboa, A.S.  
754 Ribeiro, C.L. Lencina, F.M. Stefanello, R.M. Spanevello, Combined actions of blueberry  
755 extract and lithium on neurochemical changes observed in an experimental model of  
756 mania: exploiting possible synergistic effects. *Metab. Brain Dis.* 34 (2019) 605-619.

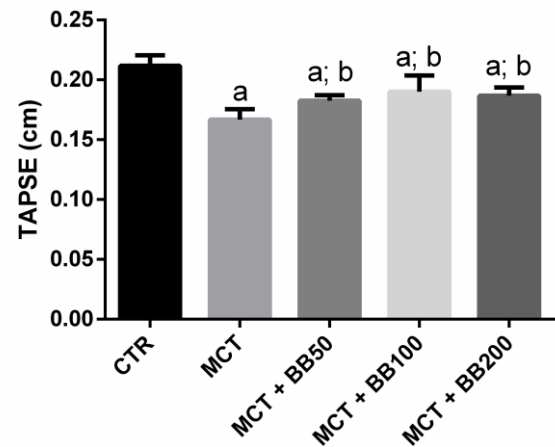
- 757 [55] S. Sharma, G. Ruffenach, S. Umar, N. Motayagheni, S.T. Reddy, M. Eghbali, Role  
758 of oxidized lipids in pulmonary arterial hypertension. *Pulm. Circ.* 6 (2016) 261-73.
- 759 [56] B. Halliwell, J.M.C Gutteridge. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed.  
760 Biosciences Oxford; 2007.
- 761 [57] S. Sahreen, M.R. Khan, R.A. Khan, Effects of *Carissa opaca* fruits extracts on  
762 oxidative pulmonary damages and fibrosis in rats, *BMC Complement. Altern. Med.* 14  
763 (2014).
- 764 [58] M.P. Murphy, A. Holmgren, N. Larsson, B. Halliwell, C.J. Chang, B. Kalyanaraman,  
765 S.G. Rhee, P.J. Thornalley, L. Partidge, D. Gems, T. Nyström, V. Belousov, P.T.  
766 Schumacker, C.C. Winterbourn, Unravelling the Biological Roles of Reactive Oxygen  
767 Species, *Cell. Metab.* 13 (2011) 361-366.
- 768 [59] Y. Wang, R. Branicky, A. Noë, S. Hekimi, Superoxide dismutases: dual roles in  
769 controlling ROS damage and regulating ROS signaling, *J. Cell Biol.* 217 (2018) 1915-  
770 1928.
- 771 [60] F.A. Masri, S.A. Comhair, I. Dostanic-Larson, F.T. Kaneko, R.A. Dweik, A.C.  
772 Arroliga, S.C. Erzurum, Deficiency of lung antioxidants in idiopathic pulmonary arterial  
773 hypertension. *Clin. Transl. Sci.* 1 (2008) 99-106.
- 774 [61] Y. Zhang, A. Kang, H. Deng, L. Shi, S. Su, L. Yu, T. Xie, J. Shan, H. Wen,  
775 Simultaneous determination of sulfur compounds from the sulfur pathway in rat plasma  
776 by liquid chromatography tandem mass spectrometry: application to the study of the  
777 effect of Shao Fu Zhu Yu decoction, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 3743-3755.
- 778 [62] P.O. Barbosa, D. Pala, C.T. Silva, M.O. de Souza, J.F. do Amaral, R.A.L. Vieira,  
779 G.A. de F. Folly, A.C.P. Volp, R.N. de Freitas, Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp dietary  
780 intake improves cellular antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women,  
781 *Nutrition.* 32 (2016) 674-680.
- 782 [63] E. Bhakkiyalakshmi, K. Dineshkumar, S. Karthik, D. Sireesh, W. Hopper, R.  
783 Paulmurugan, K.M. Ramkumar, Pterostilbene-mediated Nrf2 activation: Mechanistic  
784 insights on Keap1:Nrf2 interface, *Bioorganic Med. Chem.* 24 (2016) 3378-3386.
- 785 [64] S. Wedel, M. Manola, P. Jansen-dürr, Targeting protein quality control mechanisms  
786 by natural products to promote healthy ageing, *Molecules.* 23 (2018) E1219.
- 787 [65] H. Meghwani, P. Prabhakar, S.A. Mohammed, S. Seth, M.P. Hote, S.K. Banerjee, S.  
788 Arava, R. Ray, S.K. Maulik, Beneficial effects of aqueous extract of stem bark of  
789 *Terminalia arjuna* (Roxb.), an ayurvedic drug in experimental pulmonary hypertension,  
790 *J. Ethnopharmacol.* 197 (2017) 184-194.



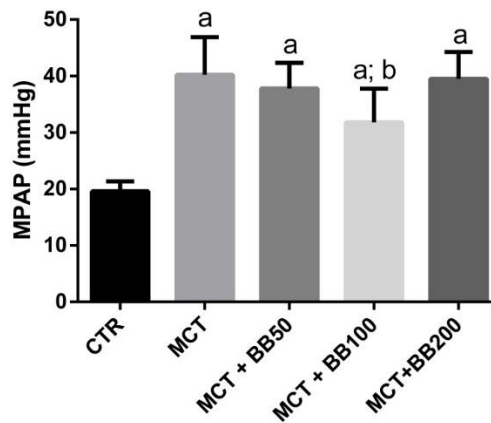
(A)



(B)

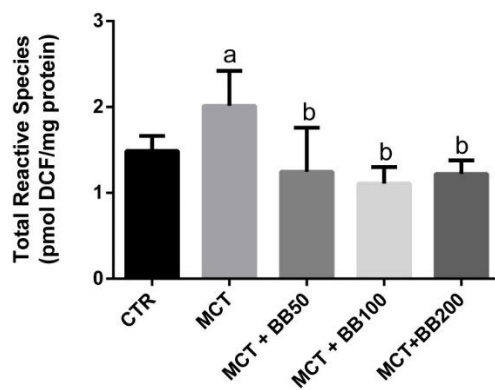


(C)

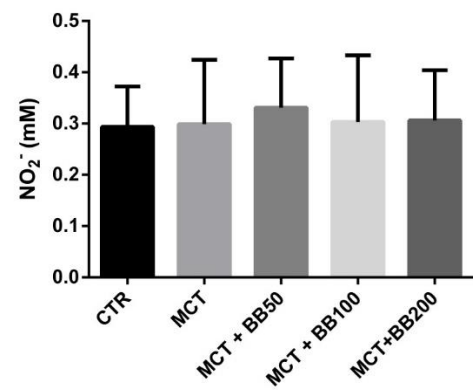


**Figure 1:** Effect of blueberry extract (BB) on (A) E/A ratio, (B) TAPSE and (C) mean arterial pressure (MPAP) in control rats (CTR,  $n_a = 8$ ;  $n_b = 8$ ;  $n_c = 6$ ) or with pulmonary arterial hypertension (MCT,  $n_a = 10$ ;  $n_b = 10$ ;  $n_c = 6$ ), (MCT+BB50,  $n_a = 10$ ;  $n_b = 10$ ;  $n_c = 8$ ), (MCT+BB100,  $n_a = 10$ ;  $n_b = 10$ ;  $n_c = 8$ ), and (MCT+BB200,  $n_a = 9$ ;  $n_b = 9$ ;  $n_c = 8$ ), treated by gavage for 35 days. Values represented as mean  $\pm$  standard deviation; one-way ANOVA followed by Tukey's post-test; a- different from CTR; b- different from MCT.

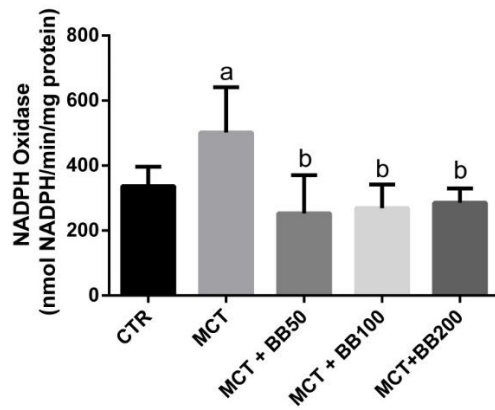
(A)



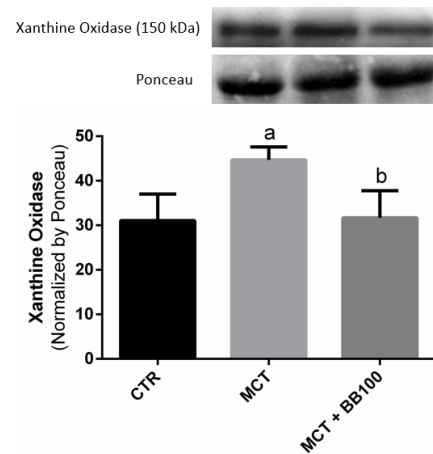
(B)



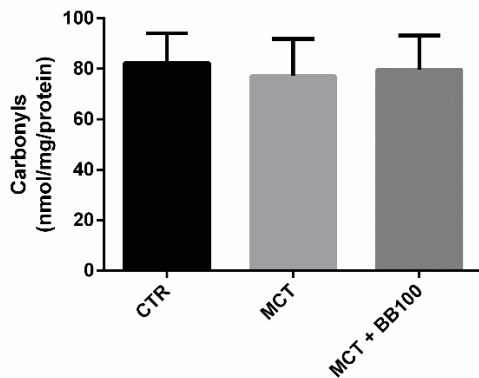
(C)



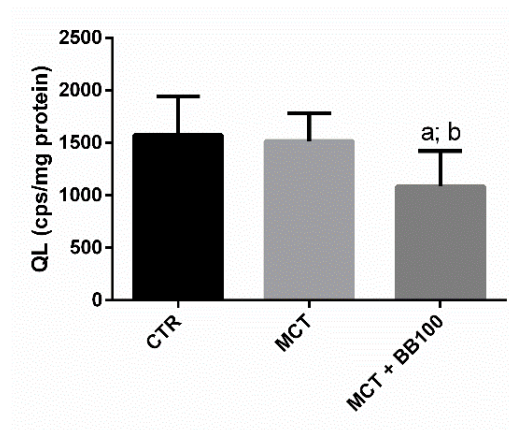
(D)



(E)

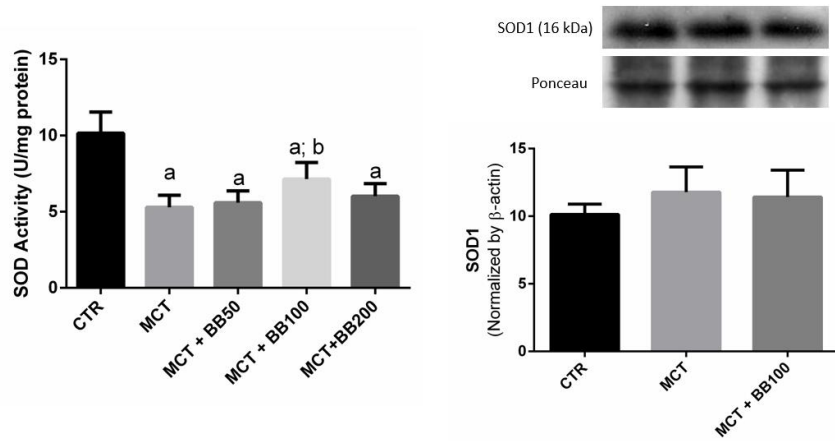


(F)

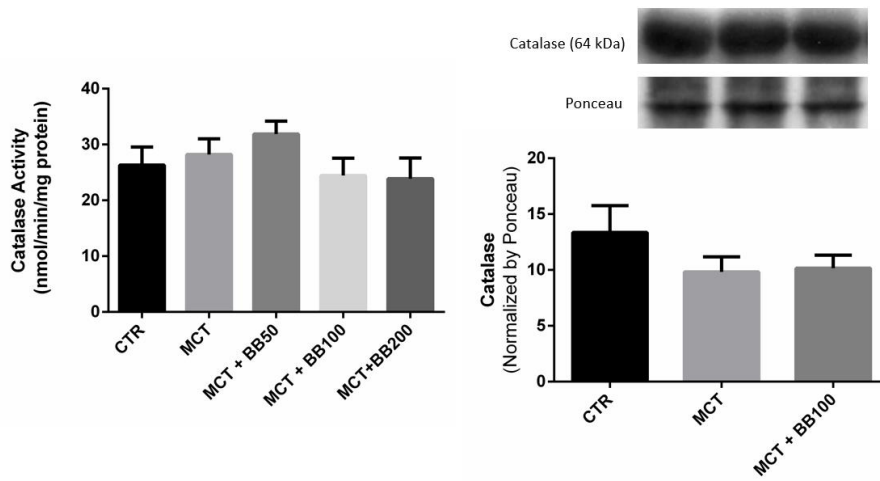


**Figure 2:** Effect of blueberry extract (BB) on (A) concentration of total reactive species, (B) total nitrite content, (C) activity of NADPH oxidase, (D) xanthine oxidase expression, (E) carbonyl content, (F) lipid oxidation in control rats (CTR,  $n_a=7$ ;  $n_b=8$ ,  $n_c=6$ ;  $n_d=6$ ;  $n_e=7$ ;  $n_f=6$ ) or with pulmonary arterial hypertension (MCT,  $n_a=6$ ;  $n_b=8$ ,  $n_c=6$ ;  $n_d=6$ ;  $n_e=8$ ;  $n_f=8$ ), (MCT+BB50,  $n_a=7$ ;  $n_b=8$ ,  $n_c=6$ ), (MCT+BB100,  $n_a=8$ ;  $n_b=9$ ,  $n_c=7$ ;  $n_d=6$ ;  $n_e=8$ ;  $n_f=8$ ), and (MCT+BB200,  $n_a=5$ ;  $n_b=6$ ,  $n_c=6$ ), treated by gavage for 35 days. Values represented as mean  $\pm$  standard deviation; one-way ANOVA followed by Tukey's post-test for (A), (B), (C), (E) and (F); Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-test for (D); a- different from CTR; b- different from MCT.

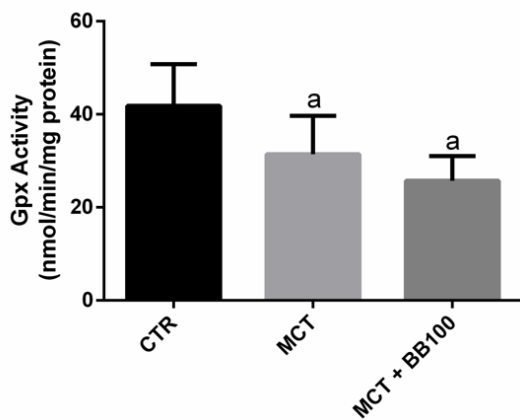
(A)



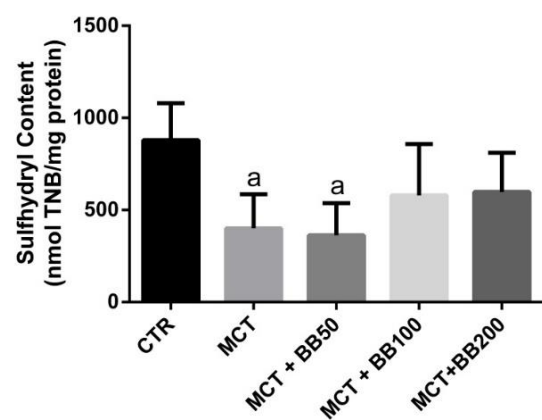
(B)



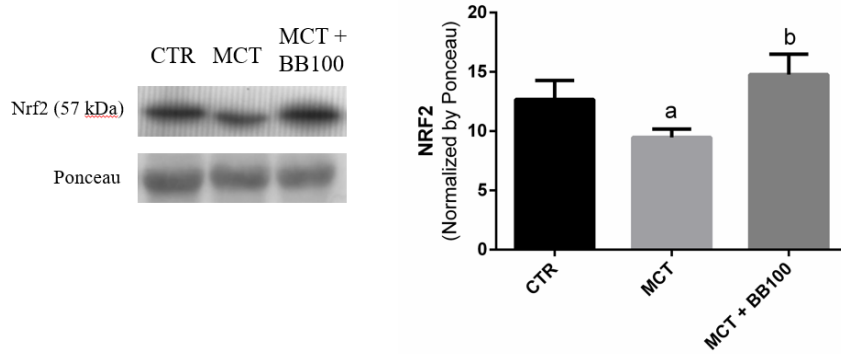
(C)



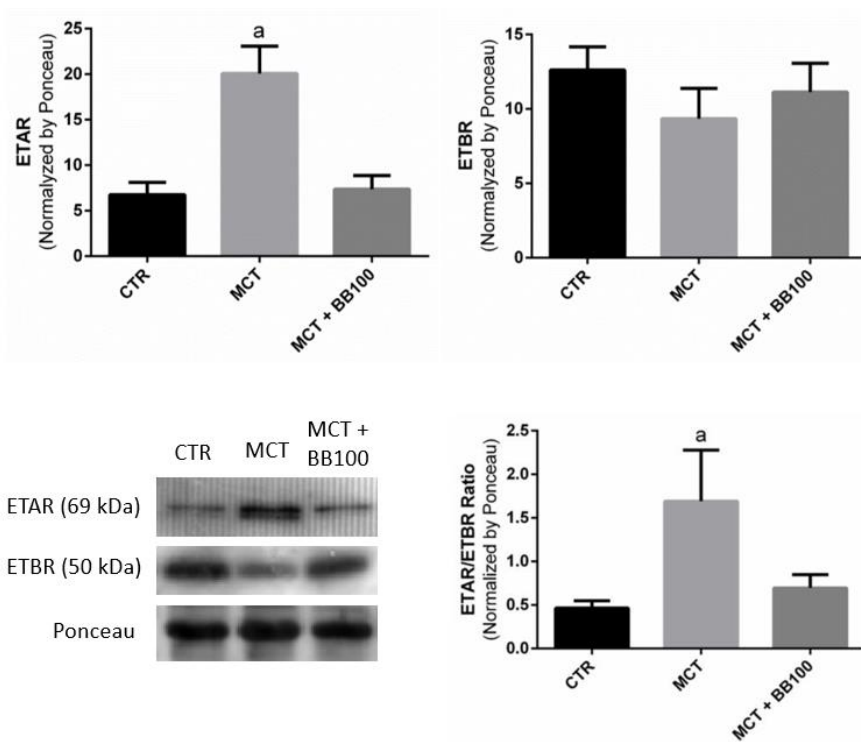
(D)



(E)

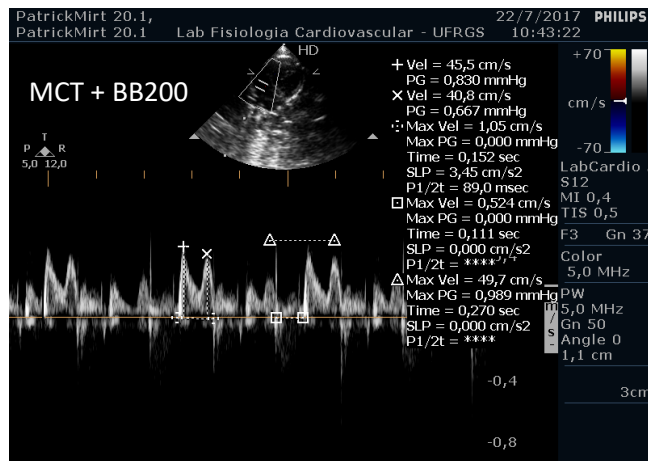
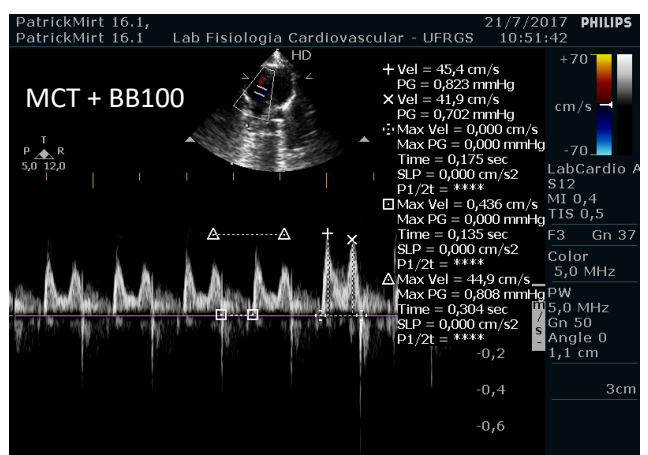
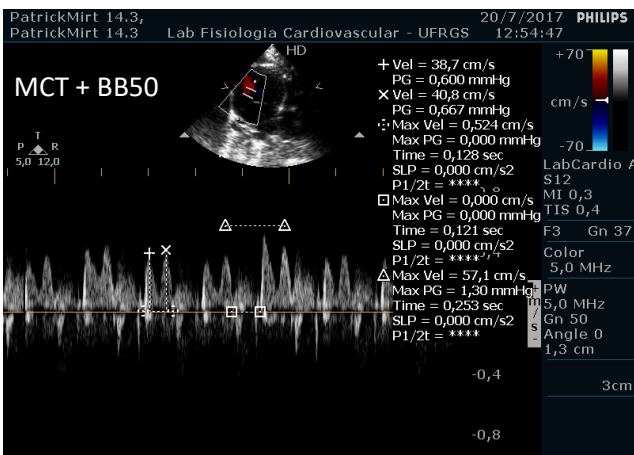
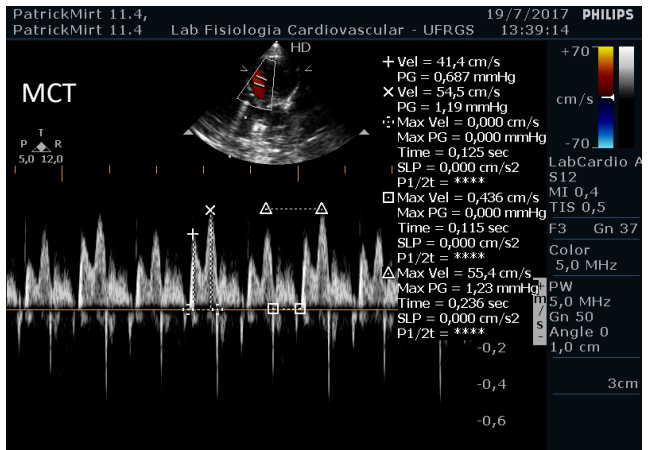
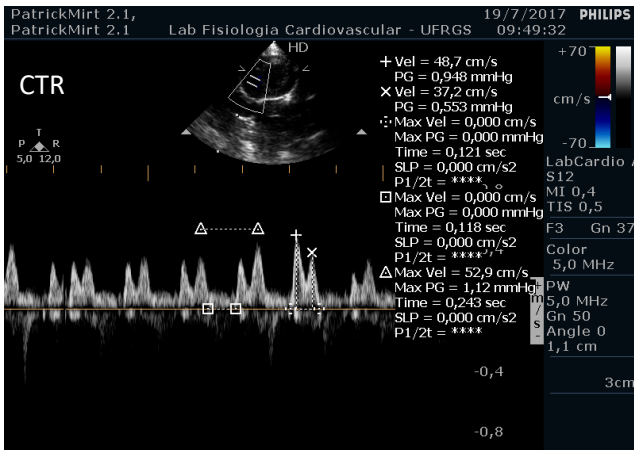


**Figure 3:** Effect of blueberry extract (BB) on (A) SOD enzyme activity and SOD Cu/Zn expression (SOD), (B) catalase enzyme activity and catalase expression, (C) GPx enzyme activity, (D) sulfhydryl content, and (E) immunocontent of Nrf2 in the lung of control rats (CTR,  $n_a=6$ ;  $n_b=6$ ;  $n_c=6$ ;  $n_d=7$ ;  $n_e=6$ ) or with pulmonary arterial hypertension (MCT,  $n_a=6$ ;  $n_b=6$ ;  $n_c=6$ ;  $n_d=7$ ;  $n_e=6$ ), (MCT+BB50,  $n_a=6$ ;  $n_b=6$ ;  $n_d=7$ ), (MCT+BB100,  $n_a=7$ ;  $n_b=6$ ;  $n_c=6$ ;  $n_d=7$ ;  $n_e=6$ ), and (MCT+BB200,  $n_a=6$ ;  $n_b=6$ ;  $n_d=5$ ), treated by gavage for 35 days. Values represented as mean  $\pm$  standard deviation; one-way ANOVA followed by Tukey's post-test for (A) and (B) enzymes activities, (C) and (D); Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-test for (A) and (B) Western blots and (E); a- different from CTR; b- different from MCT.

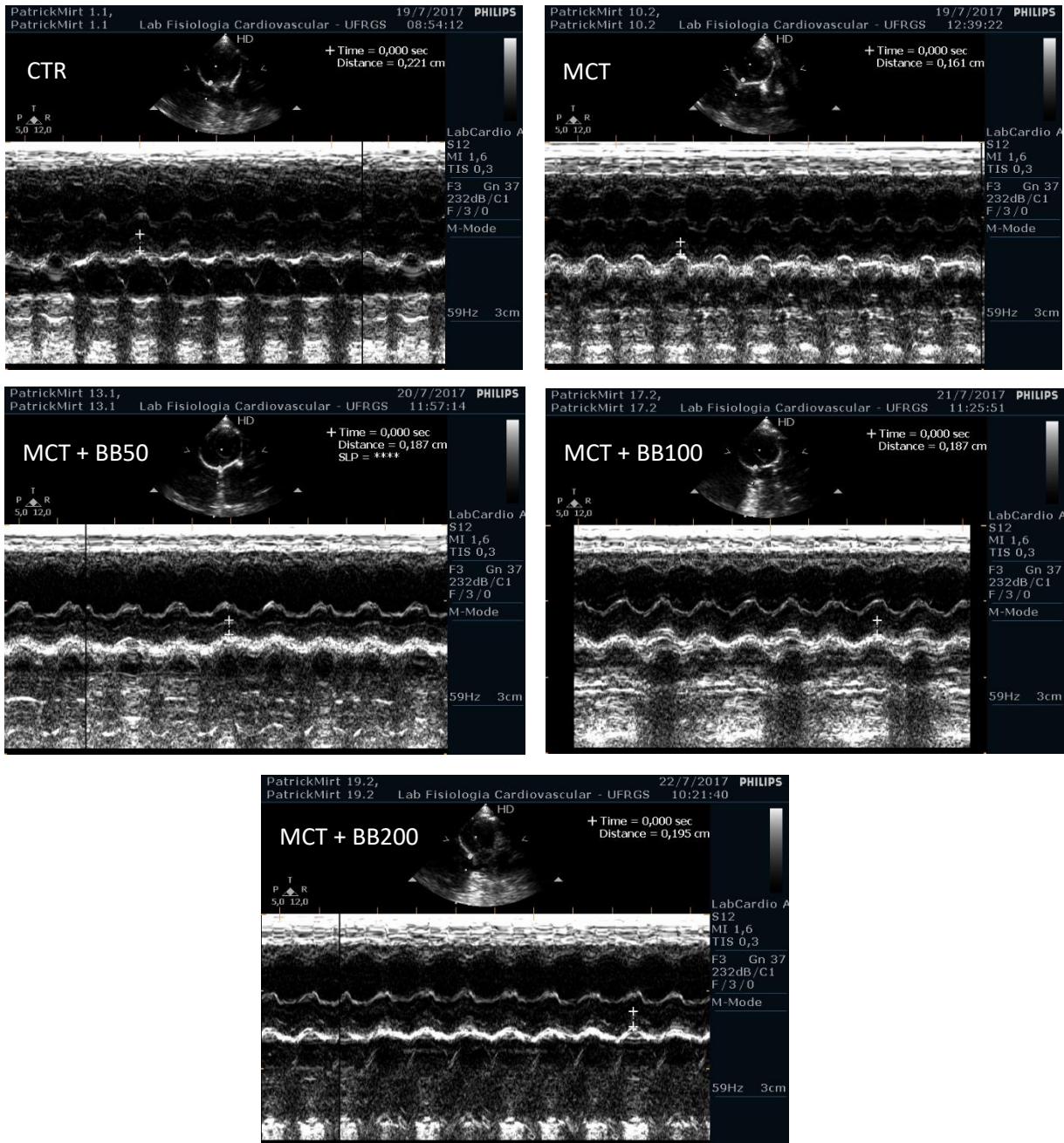


**Figure 4:** Effect of blueberry extract (BB) on the expression of ETAR, ETBR, and ETAR/ETBR ratio in the lung of control rats (CTR,  $n=6$ ) or with pulmonary arterial hypertension (MCT,  $n=6$ ), (MCT+BB100,  $n=6$ ), treated by gavage for 35 days. Values represented as mean  $\pm$  standard deviation; Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-test; a- different from CTR; b- different from MCT.

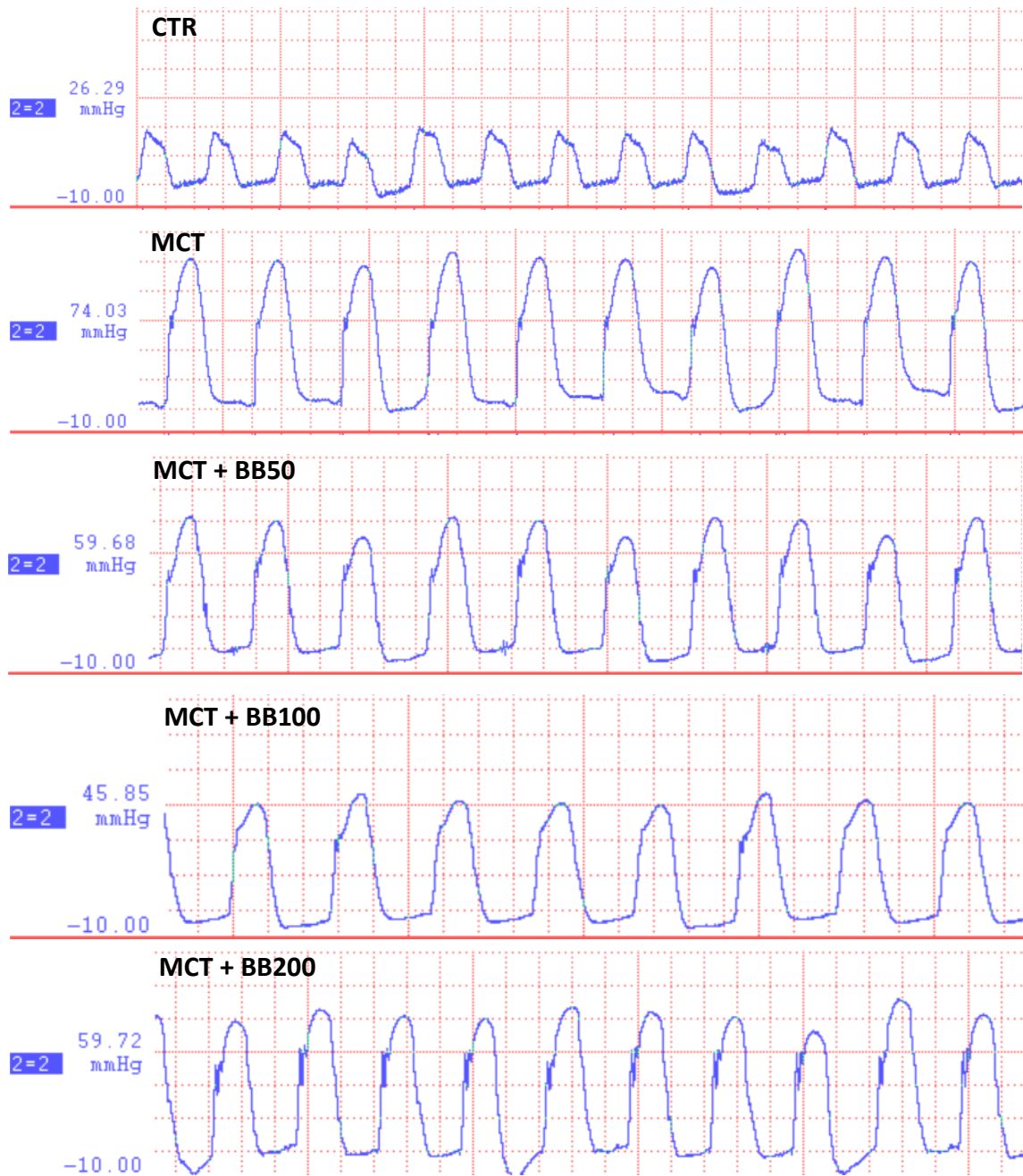
# Supplemental Material



Sup 1. Representative images of E/A ratio from the tricuspid valve flow pressure in the different experimental groups.



**Sup 2.** Representative images of tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) in the different experimental groups.



**Sup 3.** Representative images of right ventricular pressure registers in the different experimental groups.

## CAPÍTULO II

**4.2** Extrato de mirtilo melhora o equilíbrio redox e parâmetros funcionais no ventrículo direito de ratos com hipertensão arterial pulmonar.

Neste capítulo verificamos os efeitos benéficos do extrato de mirtilo sobre o VD de animais com HAP induzida por monocrotalina, focando em aspectos morfométricos, funcionais e hemodinâmicos. Sugerimos que os mecanismos terapêuticos do extrato estejam relacionados com a melhora do estado redox do VD.

**Artigo submetido para a revista Nutrition (Elsevier):**

TÜRCK P. *et al.* *Blueberry extract improves redox balance and functional parameters in the right ventricle from rats with pulmonary arterial hypertension.*



Manuscript Number:

Title: Blueberry extract improves redox balance and functional parameters in the right ventricle from rats with pulmonary arterial hypertension

Article Type: Original Investigation

Keywords: Blueberry; Pulmonary Hypertension; Right Ventricle; Oxidative Stress; Monocrotaline

Corresponding Author: Dr. Patrick Türck,

Corresponding Author's Institution: Federal University of Rio Grande do Sul

First Author: Patrick Türck

Order of Authors: Patrick Türck; Isadora S Salvador, UG; Cristina Campos-Carraro, Phd; Vanessa Ortiz, Msc; Alan C Bahr, Msc; Adriane Belló-Klein, Phd; Alex Sander R Araujo, Phd

Abstract: BACKGROUND: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a disease characterized by progressive endothelial dysfunction and vascular remodeling, leading to increased pulmonary vascular resistance and right ventricle (RV) failure. In this context, oxidative stress is an essential element that contribute to the pathophysiology of PAH. Thus, blueberry (BB), which has a high antioxidant capacity, emerges as a natural therapeutic alternative in PAH. The objective of this work was to evaluate the effect of BB extract on redox balance in RV in an animal model of PAH.

METHODS: Male Wistar rats ( $200 \pm 20$  g) ( $n = 72$ ) were randomized into eight groups: control (CTR); monocrotaline (MCT); CTR and MCT treated at doses of 50, 100, and 200 mg/kg BB. PAH was induced by the administration of monocrotaline (60 mg/kg, intraperitoneal). Rats were treated with BB via gavage for five weeks (2 weeks before monocrotaline and 3 weeks after monocrotaline injection). At day 35, rats were submitted to echocardiography and catheterization, then euthanasia and right ventricle harvesting for biochemical analyses.

RESULTS: Right ventricular hypertrophy was observed in the animals of the monocrotaline groups, indicated by the increase in the RV/body mass, RV/left ventricle mass and RV/tibia length ratios, which were attenuated when animals were treated with 100 mg/kg/day BB. Monocrotaline elevated right ventricular systolic pressure and contractility and relaxation derivatives, while treatment with 100 mg/kg/day BB decreased these parameters. Functional impairment of the RV was observed in the animals of the monocrotaline groups, which presented decreased right ventricular output and pulmonary artery outflow AT/ET ratio and increased right ventricular diameters, parameters restored in the treated groups, specially at 100 and 200 mg/kg/day doses. Animals of the MCT group showed elevated lipid peroxidation and activity of the NADPH oxidase enzyme. An improvement of the redox balance was observed in animals treated with 100 mg/kg/day BB, indicated by reduction of lipoperoxidation and activity of

the NADPH oxidase enzyme, as well as an increase in the activity of the catalase enzyme.

CONCLUSION: Treatment with the blueberry extract mitigated PAH through the improvement of the RV redox state. Our work evidences the potential use of natural antioxidant interventions as an alternative in in PAH.

To **Alessandro Laviano, Dr.**

The Editor-in-chief of Nutrition

Dear Editor,

We are submitting to your appreciation a version of the manuscript entitled **“Blueberry extract improves redox balance and functional parameters in the right ventricle from rats with pulmonary arterial hypertension”** for publication in the category of *Original Investigation* in Nutrition.

This research further analyzes the protective effects of blueberry extract’s oral administration in rats with pulmonary arterial hypertension (PAH), based on a preliminary investigation that was previously published in *Nutrition* (DOI: 10.1016/j.nut.2019.110579). The past study focused on the potential of blueberry supplementation as a nutraceutical intervention capable of resolving lungs disturbances found in PAH. In the present study, our group paid particular attention on the right ventricle, which is secondarily affected by PAH and plays a pivotal role in PAH morbidity and mortality. Treatment with blueberry extract led to improvement of right ventricular functional (exceptionally cardiac output) and hemodynamic parameters affected by PAH. These results were associated to a recovery of right ventricle redox balance.

Except for our previous work published in *Nutrition*, little is known about the effects of antioxidants-rich food supplementation in PAH. Several studies concern about the role of antioxidant and phenolic-rich natural products on left cardiac health promotion or left cardiac protection against detrimental conditions. Right ventricle is commonly neglected or left in background when it comes to dietary interventions, which reflects in sparse knowledge about these interventions’ effects on right heart in PAH, highlighting the importance of the submitted investigation.

We state that this manuscript has not been published or submitted elsewhere and in case of its acceptance in *Nutrition* we will not publish it elsewhere without the consent of the copyright owners. We also state that the rights of third parties will not be violated, and that the publisher will not be held legally responsible if there is any claim of compensation related to this manuscript. All authors have made substantial contributions to this work and agreed

to the final publication of this manuscript. The authors declare that there are no conflicts of interest. Thank you for considering our manuscript for publication in *Nutrition*.

Best regards,

**Patrick Türck, Msc.** (p.turck@gmail.com)

1 **Blueberry extract improves redox balance and**  
2 **functional parameters in the right ventricle from rats**  
3 **with pulmonary arterial hypertension**  
4  
5  
6  
7  
8

9  
10 Patrick Türck<sup>1,2\*§</sup>, Isadora Schein Salvador<sup>1§</sup>, Cristina Campos-Carraro<sup>1,2</sup>, Vanessa  
11 Ortiz<sup>1,2</sup>, Alan Bahr<sup>1,2</sup>, Adriane Belló-Klein<sup>1,2</sup>, Alex Sander da Rosa Araujo<sup>1,2</sup>  
12  
13

14  
15 § Both authors contributed equally to this work.  
16  
17  
18  
19  
20

21 <sup>1</sup> Department of Physiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio  
22 Grande do Sul (UFRGS), Brazil  
23

24 <sup>2</sup> Postgraduate Program in Biological Sciences: Physiology, Institute of Basic Health  
25 Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil  
26  
27

28  
29  
30 \* Corresponding author

31 Email address: p.turck@gmail.com (PT)  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

# Abstract

**BACKGROUND:** Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a disease characterized by progressive endothelial dysfunction and vascular remodeling, leading to increased pulmonary vascular resistance and right ventricle (RV) failure. In this context, oxidative stress is an essential element that contribute to the pathophysiology of PAH. Thus, blueberry (BB), which has a high antioxidant capacity, emerges as a natural therapeutic alternative in PAH. The objective of this work was to evaluate the effect of BB extract on redox balance in RV in an animal model of PAH.

**METHODS:** Male Wistar rats ( $200 \pm 20$  g) ( $n = 72$ ) were randomized into eight groups: control (CTR); monocrotaline (MCT); CTR and MCT treated at doses of 50, 100, and 200 mg/kg BB. PAH was induced by the administration of monocrotaline (60 mg/kg, intraperitoneal). Rats were treated with BB via gavage for five weeks (2 weeks before monocrotaline and 3 weeks after monocrotaline injection). At day 35, rats were submitted to echocardiography and catheterization, then euthanasia and right ventricle harvesting for biochemical analyses.

**RESULTS:** Right ventricular hypertrophy was observed in the animals of the monocrotaline groups, indicated by the increase in the RV/body mass, RV/left ventricle mass and RV/tibia length ratios, which were attenuated when animals were treated with 100 mg/kg/day BB. Monocrotaline elevated right ventricular systolic pressure and contractility and relaxation derivatives, while treatment with 100 mg/kg/day BB decreased these parameters. Functional impairment of the RV was observed in the animals of the monocrotaline groups, which presented decreased right ventricular output and pulmonary artery outflow AT/ET ratio and increased right ventricular diameters, parameters restored in the treated groups, specially at 100 and 200 mg/kg/day doses. Animals of the MCT group showed elevated lipid peroxidation and activity of the NADPH oxidase enzyme. An improvement of the redox balance was observed in animals treated with 100 mg/kg/day BB, indicated by reduction of lipoperoxidation and activity of the NADPH oxidase enzyme, as well as an increase in the activity of the catalase enzyme.

**CONCLUSION:** Treatment with the blueberry extract mitigated PAH through the improvement of the RV redox state. Our work evidences the potential use of natural antioxidant interventions as an alternative in in PAH.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Keywords:** Blueberry. Pulmonary Hypertension. Right Ventricle. Oxidative Stress. Monocrotaline.

## Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a clinical condition in which there is loss and obstructive remodeling of pulmonary arterial bed, characterized by smooth muscle cells unrestrained proliferation and hypertrophy, endothelium dysregulation in producing vasoactive molecules and presence of perivascular inflammation [1]. Such mechanisms lead to increase in pulmonary vascular resistance, rising the pulmonary pressure and culminating in increased afterload on the right ventricle (RV), which progressively develops hypertrophy and dilation, eventually, fails in maintaining the cardiac output. The impaired performance of RV is of crucial importance in determining the outcome of the disease [2].

Among contributing factors to PAH and RV failure, redox balance disruption plays a pivotal role. Enhanced production of reactive species and decreased antioxidant defenses, which contribute to vasoconstriction and remodeling of pulmonary vascular wall, also take part in RV dysfunction [3]. Studies using distinct animal models of PAH have shown perturbations in key components responsible for redox homeostasis in RV, having reported increased activity and/or expression of pro-oxidant enzymes, such as NADPH and xanthine oxidases, while exhibited decline in antioxidant enzymes, in particular catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase [4-6]. Such shift in redox status triggers a series of events associated with damage to cardiomyocytes calcium-handling proteins and apoptosis, fibrosis and extracellular matrix changes of RV, among other pathological processes described in PAH [4, 7-10]. In patients with PAH, oxidative stress markers have been reported to be increased and have been related to higher values of pulmonary pressure [11,12]. In fact, oxidative stress has been targeted in PAH for possible new therapies, with new clinical trials currently being performed [13].

The use of natural antioxidants as treatment in diseases that present redox imbalance in their pathophysiology has long been proposed [14], with heart diseases being benefited from antioxidants intervention [15-17]. Remarkably, small berries, that show an abundant content of antioxidant compounds, have been related to improved

1 cardiovascular risk profiles [18]. The blueberry (BB) (*Vaccinium* spp.), which has high  
2 levels of polyphenols, especially anthocyanins, has been studied in several models of  
3 cardiovascular conditions [19-21]. Intervention with BB was accompanied with  
4 attenuated cardiac dysfunction and reduced left ventricular hypertrophy, fibrosis and  
5 inflammation in a cyclophosphamide-induced cardiac injury model, effects related to  
6 improved redox balance [22]. Similarly, BB protected heart from ischemic damage,  
7 improving left ventricular function in myocardial infarction studies [23,24]. Regarding  
8 PAH, our group recently showed the benefits of BB extract on lungs of animals with  
9 PAH, which restored the redox state and contributed to attenuate pulmonary pressure via  
10 endothelin receptors modulation [25]. In the present study, we further investigate the role  
11 of BB in PAH focusing on the RV.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

## 23 **Material and Methods**

### 24 **Animals**

25  
26  
27  
28  
29  
30  
31 Wistar rats (male, 200 ± 20 grams) were provided from the Center for  
32 Reproduction and Experimentation of Laboratory Animals of the Federal University of  
33 Rio Grande do Sul. The animals were allocated in polypropylene boxes (340 x 200 x 410  
34 mm) with three/four animals per cage. Animals were kept under standard conditions:  
35 temperature (20–25°C), light–dark cycles of 12 hours and relative humidity of 70%.  
36 Water and commercial feed were offered *ad libitum*. The experimental protocol was  
37 carried out in accordance with the International Guidelines for Use and Care of  
38 Laboratory Animals and National Council for Control of Animal Experimentation. The  
39 experimental protocol began after it had been approved by the Ethical Committee for  
40 Animal Experimentation (#32192).  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

### 51 **Blueberry Extract**

52  
53  
54 The blueberry extract was purchased from Active Pharmaceutica – Brazil  
55 (Bilberry – *Vaccinium myrtillus* L. Standardized Extract), maintained at 4°C and  
56 protected from light during the experimental protocol period. Characterization (total  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1 phenolics, total flavonoids, and anthocyanidin content) of the extract was previously  
2 reported [25].  
3  
4

## 5 **Experimental Protocol**

6  
7 Blueberry extract was solubilized daily in water purified in a Milli-Q system  
8 (Millipore Corporation, MA, USA). Treatment with the extract was performed daily for  
9 five weeks (two weeks prior to the induction of PAH with monocrotaline and three weeks  
10 post-monocrotaline injection). Animals were randomly allocated in eight different  
11 groups: control (CTR); monocrotaline (MCT); CTR and MCT treated at doses of 50, 100,  
12 and 200 mg/kg BB, n = 8-10 animals per group. Animals from the BB groups received  
13 blueberry solution orally by gavage (maximum volume of 1 mL of solution for each 250  
14 g of body weight), while animals from CTR and MCT groups received ultra-pure water  
15 at the same volume. PAH was induced by a single intraperitoneal injection of  
16 monocrotaline (Crotaline – C2401 Sigma Aldrich, MI, USA) at the dose of 60 mg/kg in  
17 the MCT groups. Animals from CTR groups received a single injection of saline solution  
18 (0.9% NaCl) at the same volume. On the 35th day of the experimental protocol, right  
19 ventricular echocardiography and catheterization were performed, followed by  
20 euthanasia of animals under anesthesia with ketamine (90 mg/kg, intraperitoneal) and  
21 xylazine (10 mg/kg, intraperitoneal) by manual guillotine decapitation. Hearts were  
22 harvested and washed in cold 1.15% KCl, atria were discarded, and the RV was separated  
23 from the left ventricle (LV) + septum, weighted, maintained in liquid nitrogen during the  
24 experiments and stored at –80°C for further biochemical assays.  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

## 42 **Morphometric Analysis**

43 For hypertrophy analyses, RV was weighed and left hind paws tibias of animals  
44 were collected. Body weight of animals were determined at the day of euthanasia. The  
45 following ratios were used as indicators of right ventricular hypertrophy: RV mass/body  
46 mass, RV/left ventricle mass and RV mass/tibia's length [26].  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54

## 55 **Hemodynamic evaluation**

56 Animals were anesthetized, submitted to trichotomy of the right jugular region,  
57 and the surgical field was disinfected. The jugular was dissected and isolated. Blood flow  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 was blocked by use of a metal occluder. With obstructed flow, an incision was made in  
2 the vessel's upper wall to allow the introduction of a polyethylene (PE-50) catheter filled  
3 with saline solution (0.9% NaCl). The catheter was inserted into the right ventricle, and  
4 its position was determined by the observation of the characteristic ventricular pressure  
5 waveform. Immediately after this initial recording, followed by 5 minutes of stabilization,  
6 right ventricular diastolic and systolic pressures were recorded. Analog pressure signals  
7 were digitized (Windaq-Data Acquisition System, PC) with a sampling rate of 1000 Hz,  
8 expressed in mmHg.  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15

## 16 **RV Echocardiography**

17  
18  
19 Animals were anesthetized with ketamine (90 mg/kg, intraperitoneal) and  
20 xylazine (10 mg/kg, intraperitoneal), submitted to trichotomy of the thoracic region, and  
21 placed in the lateral decubitus position. Images were obtained using two-dimensional  
22 mode and pulsed Doppler (Philips HD7 Ultrasound System), with a S12-4 transducer.  
23 Right ventricular diastolic and systolic diameters were measured. Acceleration/ejection  
24 time ratio was measured and calculated in pulmonary artery outflow tract. Right  
25 ventricular cardiac output (CO) was determined using the heart frequency and systolic  
26 volume, which was calculated according to cross sectional area of RV outflow tract in  
27 systole and RV outflow tract velocity time integral [27].  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36

## 37 **RV Preparation for Redox Analyses**

38  
39  
40 RV homogenization was performed for 40 seconds with Ultra-Turrax (OMNI  
41 Tissue Homogeneizer, OMNI International, USA) in the presence of 1.15% KCl (5 mL/g  
42 tissue) and 100 mmol/L phenyl methyl sulfonyl fluoride. Samples were centrifuged (20  
43 minutes at 10000 x g at 4°C), and the supernatant was collected and stored at -80°C until  
44 the analyses. Protein quantification was determined as described by Lowry's method  
45 using bovine serum albumin solution as standard [28].  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52

## 53 **Redox Analyses**

54  
55 *Total reactive species*  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 Oxidation of DCFH-DA (2,3-dichlorofluorescein diacetate) to DCF in presence  
2 of the samples was used to determine total reactive species, as described previously [29].  
3 Results were expressed as pmol of DCF/mg protein.  
4  
5  
6

### 7 *Lipid oxidation*

8  
9

10  
11 Tert-butyl hydroxide (TBOOH) was added to samples and chemiluminescence  
12 (QL) production detected as and indicative of lipid peroxidation, as described previously  
13 [30]. Results were expressed as counts cps/mg protein.  
14  
15  
16  
17

### 18 *NADPH oxidase activity*

19  
20  
21

22 NADPH oxidase enzyme activity was determined spectrophotometrically by  
23 observing the consumption of NADPH over a 10-minute interval in the presence of  
24 samples, as previously indicated [31]. Results were expressed as nmol NADPH/min/mg  
25 protein.  
26  
27  
28  
29  
30

### 31 *Catalase activity*

32  
33  
34  
35

36 Catalase activity was measured through the evaluation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption, as  
37 reported previously [32]. Results were expressed as nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg protein.  
38  
39  
40  
41

### 42 *Superoxide dismutase (SOD) activity*

43  
44  
45

46 Inhibition of the reaction of the superoxide radical anion with pyrogallol was used  
47 to to determine SOD activity, as referred previously [33]. Results were expressed as U  
48 SOD/mg protein.  
49  
50  
51  
52

### 53 *Glutathione peroxidase (GPx) activity*

54  
55  
56

57 Monitoring the oxidation rate of NADPH in the presence of reduced glutathione  
58 and glutathione reductase enzyme was performed to determine GPx activity. Azide  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 (N<sub>3</sub>Na) for inhibition of catalase and TBOOH as the reaction initiator were used [34].  
2 Results were expressed as nmol NADPH/min/mg protein.  
3  
4

### 5 *Sulfhydryl content*

6  
7  
8

9 DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) conversion to TNB measured  
10 spectrophotometrically was used to detect total sulfhydryl content in samples, as indicated  
11 previously [35]. Results were expressed as nmol TNB/mg protein.  
12  
13  
14  
15  
16

### 17 **Western Blot**

18  
19  
20

21 The dose of 100 mg/kg/day BB was selected to represent the treatment group,  
22 since 100mg/kg/day BB showed more pronounced functional improvements.  
23 Electrophoresis and protein transfer were proceed as described [36]. 100 micrograms of  
24 protein from RV homogenates were subjected to sodium dodecyl sulfate  
25 monodimensional polyacrylamide gel electrophoresis in a batch system using an 8-12%  
26 (w/v) separation gel. Separated proteins were transferred through membrane  
27 electrophoresis using modified Towbin buffer containing 20 mmol/L Tris, 150 mmol/L  
28 glycine, 20% (v/v) methanol, 0.02% (w/v) SDS (pH 8.3) in a cooled Bio-Rad transfer  
29 unit. Afterwards, nonspecific protein sites were blocked by 1 h incubation in 5% (w/v)  
30 blocking solution of skim milk and 0.1% (w/v) Tris-saline buffer. The following primary  
31 antibodies were used: anti-xanthine oxidase (150 kDa), anti-catalase (64 kDa), anti-SOD1  
32 (16KDa), anti-SOD2 (16 KDa), anti-gluthatione peroxidase 1/2 (23 KDa) (Santa Cruz  
33 Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Primary antibodies were detected using  
34 peroxidase-conjugated anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies. Membranes  
35 were developed by chemiluminescence detection and visualized in GE ImageQuant LAS  
36 4000 Photodocumentator (GE Healthcare, IL, USA). Molecular weights were determined  
37 using a standard molecular weight marker (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA,  
38 USA). Results were normalized by the Ponceau method [37].  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55

### 56 **Statistics**

57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 The means and standard deviations were calculated for each of the measures  
2 performed and for each of the groups studied. The Shapiro–Wilk test was used to  
3 determine parametric data. For data with normal distribution, the comparisons were made  
4 through two and one-way ANOVA complemented with Tukey’s post-test. Kruskal-  
5 Wallis was used to compared non-parametric data, complemented Dunn’s post-test. The  
6 differences were considered significant when statistical analysis showed  $P < 0.05$ .  
7 GraphPad Instat 6.01 for Windows was used as statistical analysis tool.  
8  
9  
10  
11  
12

## 13 **Results**

### 14 **Morphometric Results**

15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
Animals from the monocrotaline groups showed increased right cardiac hypertrophy indices (RV/body mass, RV/left ventricle mass and RV/tibial length) compared to animals from control groups. Treatment with blueberry extract at a dose of 100 mg/kg/day attenuated the increase in the right cardiac hypertrophy indices when compared with the MCT group (Figure 1A, 1B and 1C).

### RV Pressure Records

There was an increase in right ventricular systolic pressure, as well as in the relaxation (dP/dt min) and contractility (dP/dt max) derivatives among animals receiving monocrotaline in relation to animals from control groups. Animals from monocrotaline group treated with blueberry extract at 100 mg/kg/day showed a decrease in right ventricular systolic pressure and contractility derivative (Figure 2A, 2B and 2C).

### Echocardiographic Parameters

Animals from non-treated monocrotaline group showed a decrease in right ventricular cardiac output and AT/ET ratio compared to animals from control group, while all tested doses of BB treatment attenuated the impairments in these cardiac parameters (Figure 3A and 3B, Sup. 1). Treatment with 100 and 200 mg/kg/day BB was also capable of preventing the increase in right ventricular systolic and diastolic diameters, which were increased in monocrotaline group (Figure 3C and 3D).

### Redox Balance Analyses

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Regarding the total content of reactive species, no difference was observed between the experimental groups (Figure 4A). However, treatment with 100 mg/kg/day BB was able to attenuate the increased lipid oxidation evidenced in the monocrotaline group (Figure 4B). Similarly, 100 mg/kg/day BB reduced the activity of NADPH oxidase enzyme, which was increased in the monocrotaline group (Figure 4C). There were no differences in xanthine oxidase enzyme expression between the groups (Figure 4D).

Treatment with 100 mg/kg/day BB was able to increase catalase enzyme activity compared to the control group. However, no differences in protein expression were observed between the different experimental groups (Figure 5A). In addition, superoxide dismutase enzyme activity was reduced in monocrotaline groups compared to control group. No differences in protein expression of the SOD1 enzyme were observed between the different experimental groups, yet SOD2 protein expression showed a decrease in monocrotaline groups (Figure 5B). No differences were observed in protein activity and expression of glutathione peroxidase enzyme, as well as in sulfhydryl content between the different experimental groups (Figure 5C and 5D).

## Discussion

PAH is a disease marked by cardiopulmonary changes that increase pulmonary vascular resistance and progressively leads to endothelial dysfunction, associated with oxidative stress, which stimulate the severity of the disease, contributing to RV dysfunction and to right heart failure [38]. Blueberry is considered a fruit with strong antioxidant characteristics, since it has high concentrations of phenolic compounds and has been linked to the improvement of oxidative stress indicators in several conditions [39-41]. This study, being a precursor in exploring a natural therapeutic alternative for the treatment of PAH, focusing especially in RV, demonstrated that BB extract was able to promote a recovery of RV redox balance state associated with improvement of morphometric and functional parameters.

Cardiac hypertrophy, even having deleterious effects, is an adaptive mechanism allowing the RV to function despite elevated pulmonary artery pressures [42]. However, the gradual RV hypertrophy developed in PAH by the increase of sustained pressure overload leads to a reduction in ejection fraction and cardiac output, which is described

1 as maladaptive hypertrophy [43]. In our study, the morphometric parameters evidenced  
2 the RV mass increase in the MCT group compared to the CTR group, in agreement with  
3 previous studies using the monocrotaline model for PAH induction [44, 45]. On the other  
4 hand, treatment with 100 mg/kg/day BB attenuated the right cardiac hypertrophy indices.  
5 Few studies reporting antioxidants intervention in PAH to reduce RV hypertrophy  
6 conducted a deeper analysis on RV function [5, 45], which led us to further evaluate RV  
7 performance.  
8  
9  
10  
11  
12

13 The increase in RV systolic pressure post-injection of monocrotaline is one of the  
14 hallmarks of the efficacy of this model in developing PAH and has been reported  
15 previously [46, 47]. Accordingly, in our study we verified an increase in RV systolic  
16 pressure, which was accompanied with increased contractility and relaxation  
17 pressure/time derivatives. Such elevation in RV systolic pressure is a repercussion of  
18 augmented pulmonary artery pressure secondary to increased pulmonary vascular  
19 resistance [48]. Increased contractility and relaxation derivatives together with  
20 cardiomyocytes hypertrophy have been reported in rats receiving monocrotaline, with  
21 different interventions reversing the increased RV pressure and the onset of hypertrophy,  
22 taking derivatives to normal levels [49, 50]. Thus, increased contractility and relaxation  
23 seems to be a compensatory mechanism by which the RV seeks to compensate its  
24 progressive loss of function with the disease's progression. In our study, treatment with  
25 BB, particularly at 100 mg/kg/day, reduced RV systolic pressure and attenuated RV  
26 contractility derivative, which indicates that the RVs of the animals that received the BB  
27 were under a lower afterload. In fact, these results are in accordance with our previous  
28 work, where we showed that BB treatment at the same dose attenuated pulmonary artery  
29 mean pressure [25].  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

45 Regarding the functional parameters of the RV, in decompensated PAH there is a  
46 significant decrease in right cardiac output, compromising the functionality of the heart  
47 [51]. Moreover, the inability in ejecting properly eventually leads to right heart failure  
48 with progression to left-side heart failure, mainly due to RV extensive hypertrophy  
49 causing interventricular septal deviation, culminating in compression of the left ventricle  
50 [52]. The difficult in right heart ejection is accompanied with a typical reduction in  
51 acceleration/ejection time (AT/ET) ratio observed in pulmonary artery outflow, which is  
52 a consequence of elevated pulmonary vascular resistance and indicates a systolic  
53 decompensation [53]. In the present study, a decrease in RV cardiac output and AT/ET  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 ratio was found in the MCT group compared to CTR, whereas in all treated group, BB  
2 improved RV these functional measurements. Furthermore, we observed increased RV  
3 systolic and diastolic diameters, indicating chamber's dilation that may occur as a  
4 consequence of facing the progressive increase in afterload [54]. Treatment with BB  
5 attenuated the increase in RV diameters, which supports the functional improvements  
6 observed. Such findings are consistent with our previous report, in which treatment with  
7 100 mg/kg/day BB led to improvements of both systolic and diastolic RV function [25].  
8  
9

10  
11  
12  
13 The RV hemodynamic and functional improvements caused by BB treatment can  
14 be related to the fact that the BB contains in its nutritional composition an expressive  
15 amount of phenolic compounds that act as potential antioxidants [55]. The ability of BB  
16 phenolic compounds to attenuate vascular changes, as well as to increase survival of  
17 cardiomyocytes in a cardiac ischemia model when administered in the diet was previously  
18 reported [24]. Moreover, phenolic fractions of BB extract protected cardiomyocytes from  
19 norepinephrine injury, preventing impairments in their contractility through positive  
20 regulation of several antioxidant defenses [20]. In an animal model of cyclophosphamide-  
21 induced cardiac injury, BB extract reduced fibrosis, inflammation and left ventricular  
22 dysfunction, results also related to increased antioxidant defenses [22]. Thus, these data  
23 indicate the benefic effects of BB on cardiac cells are associated with modulation of  
24 cellular redox state.  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35

36 Oxidative stress can cause serious damage to cellular components and is reported  
37 as a major contributor to several diseases, including PAH [56]. In our study, total reactive  
38 species did not differ in RV of animals between the groups. This may have been a  
39 consequence of the DCFDA assay, which have some limitations such as it's lack of  
40 specificity for a determined reactive species source [57]. Endothelial injury in PAH was  
41 associated with increased  $O_2^{\cdot-}$  concentration, resulting in loss of redox balance [58]. An  
42 important source of  $O_2^{\cdot-}$  in PAH is the enzyme NADPH oxidase found in the smooth  
43 muscle cells of the pulmonary arteries, with previous data showing its increased activity  
44 and expression in rats with MCT-induced PAH [59, 60]. In this sense, in the present study,  
45 MCT group showed higher activity of this pro-oxidant enzyme, while animals treated  
46 with BB demonstrated reduction in NADPH oxidase activity. Increased production of  $O_2^{\cdot-}$   
47 could have taken to elevated lipid oxidation observed in MCT group. The increase in  
48 oxidation of lipids has been linked to injuries to the sarcolemma and elements of  
49 cytoskeleton of cardiac cells, with consequent cell death [61]. Since treatment with BB  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1 abrogated the raised levels of lipid oxidation, this could have contributed to  
2 cardiomyocytes calcium-handling homeostasis and survival. In PAH, another described  
3 source of reactive species is the xanthine oxidase enzyme [62]. However, we did not  
4 observe changes in the immunocontent of this enzyme in RV between the groups in our  
5 study. Alterations in xanthine oxidase may occur more pronouncedly in pulmonary  
6 vasculature, in which exacerbated levels of  $O_2^{\cdot-}$  could impair oxide nitric formation and  
7 contribute to increased pulmonary vascular resistance, indirectly affecting RV [25].  
8  
9

10  
11  
12  
13 Regarding the antioxidant system, BB leaf extract increased catalase activity,  
14 resulting in decreased lipid oxidation and heart protection in a model of isoprenaline-  
15 induced cardiac hypertrophy [63]. A similar finding was observed in our work, in which  
16 rats treated with BB showed elevation of catalase activity in RV compared to CTR and  
17 MCT groups. In PAH, reduced activities of superoxide dismutase and glutathione  
18 peroxidase enzymes have been reported [64], with the first having its activity diminished  
19 in the RV of MCT animals in our study. BB treatment did not restore superoxide  
20 dismutase or change glutathione peroxidase activities, differently from previous data [20,  
21 22]. However, these results can be explained considering that BB was shown to be  
22 negatively regulating NADPH oxidase activity and positively influencing catalase  
23 activity, which would lead to decreased levels of  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$ , in a scenario where other  
24 distinctive antioxidant mechanisms activation may not be necessary, including sulfhydryl  
25 content modifications. Another point to consider is that particular redox status changes  
26 can vary between different models of PAH, distinctive times of analyses after PAH  
27 induction and tissues under analysis [62]. Overall, BB treatment reestablished RV redox  
28 homeostasis, similarly as we reported for lung tissue [25], promoting cardiac functional  
29 benefits.  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

## 48 **Conclusion**

49  
50  
51 BB extract, specially at the dose of 100 mg/kg/day, attenuated the worsening of  
52 RV functional parameters in PAH, associated with the improvement of the RV redox  
53 state. Dietary interventions with antioxidant-rich foods had sparsely been explored in  
54 PAH, specially aiming the RV. In our study, we showed that BB supplementation can be  
55 considered an effective dietary strategy to promote benefits and protection against the  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

development of chronic progressive cardiovascular diseases that compromise redox balance, such as PAH.

## Financial Support

This work received financial support from the following Brazilian development agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## References

- [1] Humbert M, Guignabert C, Bonnet S, Dorfmüller P, Klinger JR, Nicolls MR, Olschewski AJ, Pullamsetti SS, Schermuly RT, Stenmark KR, Rabinovitch M. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives. *Eur Respir J*. 2019; 53(1): pii: 1801887.
- [2] Vonk Noordegraaf A, Chin KM, Haddad F, Hassoun PM, Hemnes AR, Hopkins SR6, Kawut SM, Langleben D, Lumens J, Naeije R. Pathophysiology of the right ventricle and of the pulmonary circulation in pulmonary hypertension: an update. *Eur Respir J*. 2019; 53(1): pii: 1801900.
- [3] Demarco VG, Whaley-Connell AT, Sowers JR, Habibi J, Dellsperger KC. Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. *World J Cardiol*. 2010; 2(10): 316-24.
- [4] Wang X, Shults NV, Suzuki YJ. Oxidative profiling of the failing right heart in rats with pulmonary hypertension. *PLoS One*. 2017; 12(5): e0176887.

1 [5] Dos Santos Lacerda D, Türck P, Gazzi de Lima-Seolin B, Colombo R, Duarte Ortiz  
2 V, Poletto Bonetto JH, Campos-Carraro C, Bianchi SE, Belló-Klein A, Linck Bassani V,  
3 Sander da Rosa Araujo A. Pterostilbene reduces oxidative stress, prevents hypertrophy  
4 and preserves systolic function of right ventricle in cor pulmonale model. *Br J Pharmacol.*  
5 2017; 174(19): 3302-3314.  
6

7  
8  
9  
10 [6] Mikhael M, Makar C, Wissa A, Le T, Eghbali M, Umar S. Oxidative stress and its  
11 implications in the right ventricular remodeling secondary to pulmonary hypertension.  
12 *Front. Physiol.* 2019; *in press*. DOI: 10.3389/fphys.2019.01233.  
13  
14

15  
16 [7] Yet SF, Perrella MA, Layne MD, Hsieh CM, Maemura K, Kobzik L, Wiesel P,  
17 Christou H, Kourembanas S, Lee ME. Hypoxia induces severe right ventricular dilatation  
18 and infarction in heme oxygenase-1 null mice. *J Clin Invest.* 1999; 103(8): R23-9.  
19  
20

21  
22 [8] Türck P, Lacerda DS, Carraro CC, de Lima-Seolin BG, Teixeira RB, Poletto Bonetto  
23 JH, Colombo R, Schenkel PC, Belló-Klein A, da Rosa Araujo AS. Trepidil improves  
24 hemodynamic, echocardiographic and redox state parameters of right ventricle in  
25 monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension model. *Biomed Pharmacother.*  
26 2018; 103: 182-190.  
27  
28

29  
30  
31 [9] Chaumais MC, Ranchoux B, Montani D, Dorfmueller P, Tu L, Lecerf F, Raymond N,  
32 Guignabert C, Price L, Simonneau G, Cohen-Kaminsky S, Humbert M, Perros F. N-  
33 acetylcysteine improves established monocrotaline-induced pulmonary hypertension in  
34 rats. *Respir Res.* 2014; 15: 65.  
35  
36

37  
38  
39 [10] Zimmer A, Teixeira RB, Bonetto JHP, Bahr AC, Türck P, de Castro AL, Campos-  
40 Carraro C, Visioli F, Fernandes-Piedras TR, Casali KR, Scassola CMC, Baldo G, Araujo  
41 AS, Singal P, Belló-Klein A. Role of inflammation, oxidative stress, and autonomic  
42 nervous system activation during the development of right and left cardiac remodeling in  
43 experimental pulmonary arterial hypertension. *Mol Cell Biochem.* 2019; *in press*. DOI:  
44 10.1007/s11010-019-03652-2.  
45  
46

47  
48 [11] Reis GS, Augusto VS, Silveira AP, Jordão AA Jr, Baddini-Martinez J, Poli Neto O,  
49 Rodrigues AJ, Evora PR. Oxidative-stress biomarkers in patients with pulmonary  
50 hypertension. *Pulm Circ.* 2013; 3(4): 856-61.  
51  
52

1 [12] Ghasemzadeh N, Patel RS, Eapen DJ, Veledar E, A Kassem H, Manocha P, Khayata  
2 M, Zafari AM, Sperling L, Jones DP, Quyyumi AA. Oxidative stress is associated with  
3 increased pulmonary artery systolic pressure in humans. *Hypertension*. 2014; 63(6):1270-  
4 5.  
5

6  
7  
8 [13] Sitbon O, Gomberg-Maitland M, Granton J, Lewis MI, Mathai SC, Rainisio M,  
9 Stockbridge NL, Wilkins MR, Zamanian RT, Rubin LJ. Clinical trial design and new  
10 therapies for pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2019; 53(1): pii: 1801908.  
11  
12

13  
14 [14] Balz Frei. *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*. 1st ed. Academic  
15 Press; 1994.  
16

17  
18 [15] Belló-Klein A, Khaper N, Llesuy S, Vassallo DV, Pantos C. Oxidative stress and  
19 antioxidant strategies in cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014:  
20 678741.  
21  
22

23  
24 [16] Mangge H, Becker K, Fuchs D, Gostner JM. Antioxidants, inflammation and  
25 cardiovascular disease. *World J Cardiol*. 2014; 6(6): 462-77.  
26  
27

28  
29 [17] Jain AK, Mehra NK, Swarnakar NK. Role of Antioxidants for the Treatment of  
30 Cardiovascular Diseases: Challenges and Opportunities. *Curr Pharm Des*. 2015; 21(30):  
31 4441-55.  
32  
33

34  
35 [18] Basu A, Rhone M, Lyons TJ. Berries: emerging impact on cardiovascular health.  
36 *Nutr Rev*. 2010; 68(3): 168-77.  
37  
38

39  
40 [19] Eladwy RA, Mantawy EM, El-Bakly WM, Fares M, Ramadan LA, Azab SS.  
41 Mechanistic insights to the cardioprotective effect of blueberry nutraceutical extract in  
42 isoprenaline-induced cardiac hypertrophy. *Phytomedicine*. 2018; 51:84-93.  
43  
44

45  
46 [20] Louis XL, Thandapilly SJ, Kalt W, Vinqvist-Tymchuk M, Aloud BM, Raj P, Yu L,  
47 Le H, Netticadan T. Blueberry polyphenols prevent cardiomyocyte death by preventing  
48 calpain activation and oxidative stress. *Food Funct*. 2014; 5(8):1785-94.  
49  
50

51  
52 [21] Song Y, Huang L, Yu J. Effects of blueberry anthocyanins on retinal oxidative stress  
53 and inflammation in diabetes through Nrf2/HO-1 signaling. *J Neuroimmunol*. 2016;  
54 301:1-6.  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 [22] Liu Y, Tan D, Shi L, Liu X, Zhang Y, Tong C, Song D, Hou M. Blueberry  
2 Anthocyanins-Enriched Extracts Attenuate Cyclophosphamide-Induced Cardiac Injury.  
3 PLoS One. 2015; 10(7): e0127813.  
4

5  
6 [23] Ahmet I, Spangler E, Shukitt-Hale B, Juhaszova M, Sollott SJ, Joseph JA, Ingram  
7 DK, Talan M. Blueberry-enriched diet protects rat heart from ischemic damage. PLoS  
8 One. 2009; 4(6): e5954.  
9

10  
11 [24] Ahmet I, Spangler E, Shukitt-Hale B, Joseph JA, Ingram DK, Talan M. Survival and  
12 cardioprotective benefits of long-term blueberry enriched diet in dilated cardiomyopathy  
13 following myocardial infarction in rats. PLoS One. 2009; 4(11): e7975.  
14  
15

16 [25] Türck P, Fraga S, Salvador I, Campos-Carraro C, Lacerda D, Bahr A, Ortiz V,  
17 Hickmann A, Koetz M, Belló-Klein A, Henriques A, Agostini F, da Rosa Araujo AS.  
18 Blueberry extract decreases oxidative stress and improves functional parameters in lungs  
19 from rats with pulmonary arterial hypertension. Nutrition. 2019; *in press*. DOI:  
20 10.1016/j.nut.2019.110579.  
21  
22

23 [26] Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length  
24 to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. Am J Physiol. 1982; 243(6):  
25 H941-7.  
26  
27

28 [27] Augustine DX, Coates-Bradshaw LD, Willis J, Harkness A, Ring L, Grapsa J,  
29 Coghlan G, Kaye N, Oxborough D, Robinson S, Sandoval J, Rana BS, Siva A,  
30 Nihoyannopoulos P, Howard LS, Fox K, Bhattacharyya S, Sharma V, Steeds RP, Mathew  
31 T. Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension: a guideline protocol from  
32 the British Society of Echocardiography. Echo Res Pract. 2018; 5(3): G11-G24.  
33  
34

35 [28] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the  
36 Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193(1): 265-75.  
37  
38

39 [29] [34] C.P. Lebel, H. Ischiropoulos, S.C. Bondy, Evaluation of the Probe 2',7'-  
40 Dlchlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative  
41 Stress. Chem Res Toxicol. 1992; 5(2): 227-31.  
42  
43

44 [30] S.F. Llesuy, J. Milei, B.S. Gonzalez Flecha, A. Boveris, Myocardial damage induced  
45 by doxorubicins: hydroperoxide-initiated chemiluminescence and morphology. Free  
46 Radic Biol Med. 1990; 8(3): 259-64.  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 [31] Wei Y, Sowers JR, Nistala R, Gong H, Uptergrove GM, Clark SE, Morris EM, Szary  
2 N, Manrique C, Stump CS. Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs  
3 insulin signaling in skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 2006; 281(46): 35137-46.  
4

5  
6 [32] Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General  
7 properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 1973; 134(3): 707-16.  
8  
9

10 [33] Marklund SL. Superoxide dismutase isoenzymes in tissues and plasma from New  
11 Zealand black mice, nude mice and normal BALB/c mice. *Mutat Res.* 1985; 148(1-2):  
12 129-34.  
13  
14  
15

16 [34] Mills GC. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme  
17 which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem.* 1957; 229(1): 189-  
18 97.  
19  
20  
21  
22

23 [35] Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of  
24 glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's  
25 disease. *Neurosci Lett.* 2001; 302(2-3): 141-5.  
26  
27  
28

29 [36] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of  
30 bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259): 680-5.  
31  
32  
33

34 [37] Klein D, Kern RM, Sokol RZ. A method for quantification and correction of proteins  
35 after transfer to immobilization membranes. *Biochem Mol Biol Int.* 1995; 36(1): 59-66.  
36  
37  
38

39 [38] Galiè N, Humbert M, Vachiery J, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G,  
40 Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Sanchez MAG, Hansmann G,  
41 Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT,  
42 Zompatori M, Hoeper M. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of  
43 pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2015; 46: 903-975.  
44  
45  
46  
47  
48

49 [39] Nair AR, Mariappan N, Stull AJ, Francis J. Blueberry supplementation attenuates  
50 oxidative stress within monocytes and modulates immune cell levels in adults with  
51 metabolic syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Food Funct.*  
52 2017; 8(11): 4118-4128.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 [40] Eladwy RA, Mantawy EM, El-Bakly WM, Fares M, Ramadan LA, Azab SS.  
2 Mechanistic insights to the cardioprotective effect of blueberry nutraceutical extract in  
3 isoprenaline-induced cardiac hypertrophy. *Phytomedicine*. 2018; 51: 84-93.  
4

5  
6 [41] Sun Y, Nemec-Bakk AS, Mallik AU, Bagchi AK, Singal PK, Khaper N. Blueberry  
7 extract attenuates doxorubicin-induced damage in H9c2 cardiac cells. *Can J Physiol*  
8 *Pharmacol*. 2019; 97(9): 880-884.  
9

10  
11 [42] von Siebenthal C, Aubert JD, Mitsakis P, Yerly P, Prior JO, Nicod LP. Pulmonary  
12 Hypertension and Indicators of Right Ventricular Function. *Front Med (Lausanne)*. 2016;  
13 3:23.  
14  
15

16  
17 [43] Ryan JJ, Huston J, Kutty S, Hatton ND, Bowman L, Tian L, Herr JE, Johri AM,  
18 Archer SL. Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension.  
19 *Can J Cardiol*. 2015; 31(4): 391-406.  
20  
21

22  
23 [44] Lima-Seolin BG, Colombo R, Bonetto JHP, Teixeira RB, Donatti LM, Casali KR,  
24 Godoy AEG, Litvin IE, Schenkel PC, Rosa Araujo ASD, Belló-Klein A. Bucindolol  
25 improves right ventricle function in rats with pulmonary arterial hypertension through the  
26 reversal of autonomic imbalance. *Eur J Pharmacol*. 2017; 798: 57-65.  
27  
28

29  
30 [45] Campos-Carraro C, Turck P, de Lima-Seolin BG, Tavares AMV, Dos Santos  
31 Lacerda D, Corssac GB, Teixeira RB, Hickmann A, Llesuy S, da Rosa Araujo AS, Belló-  
32 Klein A. Copaiba Oil Attenuates Right Ventricular Remodeling by Decreasing  
33 Myocardial Apoptotic Signaling in Monocrotaline-Induced Rats. *J Cardiovasc*  
34 *Pharmacol*. 2018; 72(5): 214-221.  
35  
36

37  
38 [46] Jasińska-Stroschein M, Owczarek J, Sołtysiak U, Orszulak-Michalak D.  
39 Rosuvastatin intensifies the beneficial effects of rho-kinase inhibitor in reversal of  
40 monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Arch Med Sci*. 2016; 12(4): 898-905.  
41  
42

43  
44 [47] Huang Z, Liu Z, Luo Q, Zhao Z, Zhao Q, Zheng Y, Xi Q, Tang Y. Glycoprotein 130  
45 Inhibitor Ameliorates Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. *Can J*  
46 *Cardiol*. 2016; 32(11): 1356.e1-1356.e10.  
47  
48

49  
50 [48] Harrison A, Hatton N, Ryan JJ. The right ventricle under pressure: evaluating the  
51 adaptive and maladaptive changes in the right ventricle in pulmonary arterial  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 hypertension using echocardiography (2013 Grover Conference series). *Pulm Circ.* 2015;  
2 5(1):29-47.  
3

4 [49] Falcão-Pires I, Gonçalves N, Henriques-Coelho T, Moreira-Gonçalves D, Roncon-  
5 Albuquerque Jr R, Leite-Moreira AF. Apelin decreases myocardial injury and improves  
6 right ventricular function in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J*  
7 *Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 296(6): H2007-14.  
8  
9

10 [50] Türck P, Lacerda DS, Carraro CC, de Lima-Seolin BG, Teixeira RB, Poletto Bonetto  
11 JH, Colombo R, Schenkel PC, Belló-Klein A, da Rosa Araujo AS. Trepidil improves  
12 hemodynamic, echocardiographic and redox state parameters of right ventricle in  
13 monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension model. *Biomed Pharmacother.*  
14 2018;103:182-190.  
15  
16  
17

18 [51] Vonk Noordegraaf A, Galiè N. The role of the right ventricle in pulmonary arterial  
19 hypertension. *Eur Respir Rev.* 2011; 20(122): 243-53.  
20  
21

22 [52] Howard LS, Grapsa J, Dawson D, Bellamy M, Chambers JB, Masani ND,  
23 Nihoyannopoulos P, Simon R Gibbs J. Echocardiographic assessment of pulmonary  
24 hypertension: standard operating procedure. *Eur Respir Rev.* 2012; 21(125): 239-48.  
25  
26

27 [53] Pasierski TJ, Starling RC, Binkley PF, Pearson AC. Echocardiographic evaluation  
28 of pulmonary artery distensibility. *Chest.* 1999; 103(4): 1080-3.  
29  
30  
31

32 [54] Naeije R, Manes A. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *Eur*  
33 *Respir Rev.* 2014; 23(134): 476-87.  
34  
35

36 [55] Skrovankova S, Sumczynski D, Mlcek J, Jurikova T, Sochor J. Bioactive  
37 Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *Int J Mol Sci.*  
38 2015;16(10): 24673-706  
39  
40

41 [56] Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G,  
42 Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv*  
43 *Aging.* 2018; 13: 757-772.  
44  
45  
46

47 [57] Kalyanaraman B, Darley-USmar V, Davies KJ, Dennery PA, Forman HJ, Grisham  
48 MB, Mann GE, Moore K, Roberts LJ 2nd, Ischiropoulos H. Measuring reactive oxygen  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1 and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol*  
2 *Med.* 2012; 52(1): 1-6.

3  
4 [58] Demarco VG, Whaley-Connell AT, Sowers JR, Habibi J, Dellsperger KC.  
5 Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. *World J Cardiol.*  
6 2010; 2(10): 316-24.

7  
8 [59] Veit F, Pak O, Egemnazarov B, Roth M, Kosanovic D, Seimetz M, Sommer N,  
9 Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, Brandes RP, Schermuly RT, Weissmann N.  
10 Function of NADPH oxidase 1 in pulmonary arterial smooth muscle cells after  
11 monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling. *Antioxid Redox Signal.* 2013;  
12 19(18) :2213-31.

13  
14 [60] Huetsch JC, Suresh K, Shimoda LA. Regulation of Smooth Muscle Cell Proliferation  
15 by NADPH Oxidases in Pulmonary Hypertension. *Antioxidants (Basel).* 2019; 8(3).

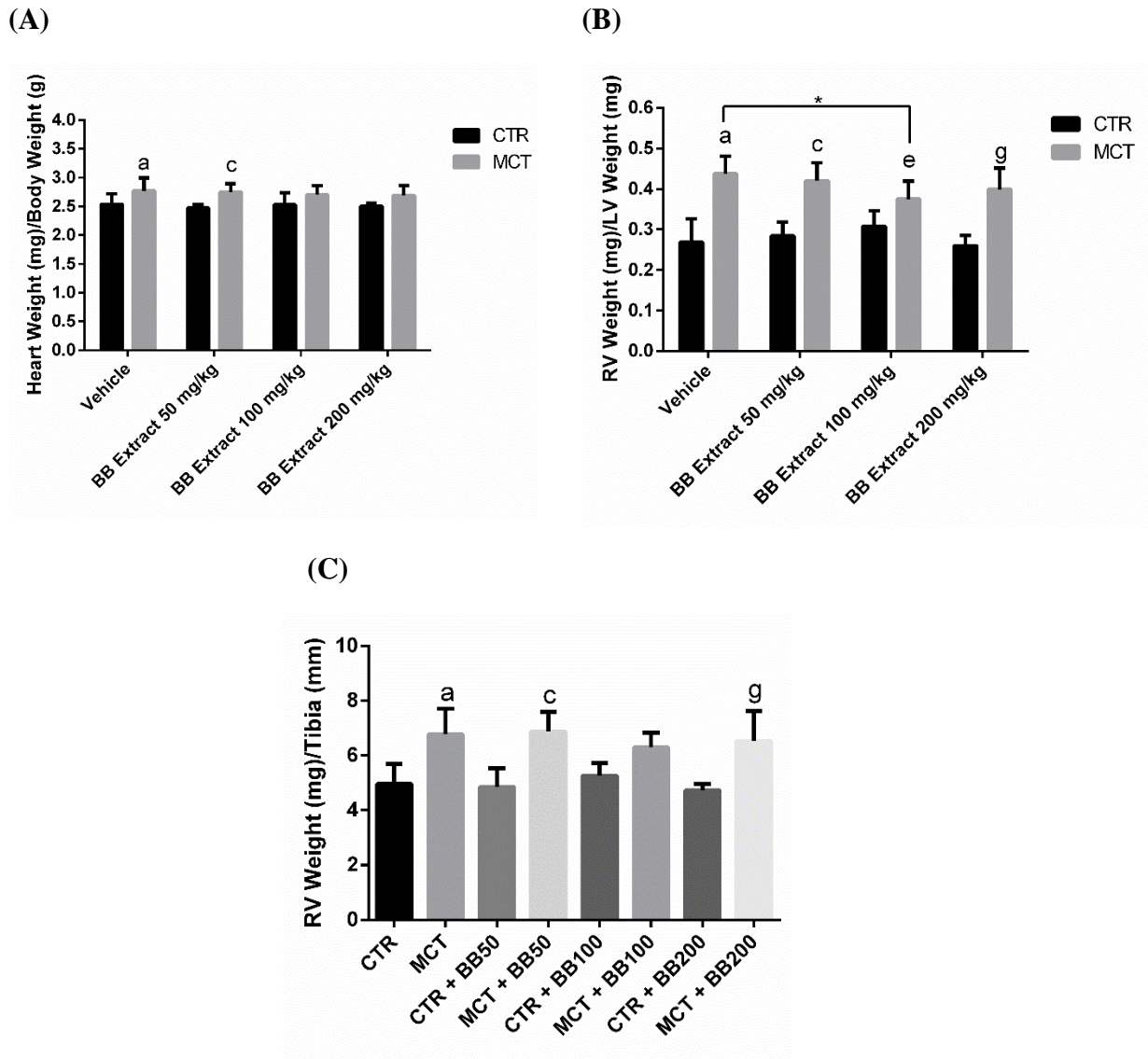
16  
17 [61] VanWinkle WB, Snuggs M, Miller JC, Buja LM. Cytoskeletal alterations in cultured  
18 cardiomyocytes following exposure to the lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal.  
19 *Cell Motil Cytoskeleton.* 1994; 28(2): 119-34.

20  
21 [62] Aggarwal S, Gross CM, Sharma S, Fineman JR, Black SM. Reactive oxygen species  
22 in pulmonary vascular remodeling. *Compr Physiol.* 2013; 3(3): 1011-34.

23  
24 [63] Eladwy RA, Mantawy EM, El-Bakly WM, Fares M, Ramadan LA, Azab SS.  
25 Mechanistic insights to the cardioprotective effect of blueberry nutraceutical extract in  
26 isoprenaline-induced cardiac hypertrophy. *Phytomedicine.* 2018; 51: 84-93.

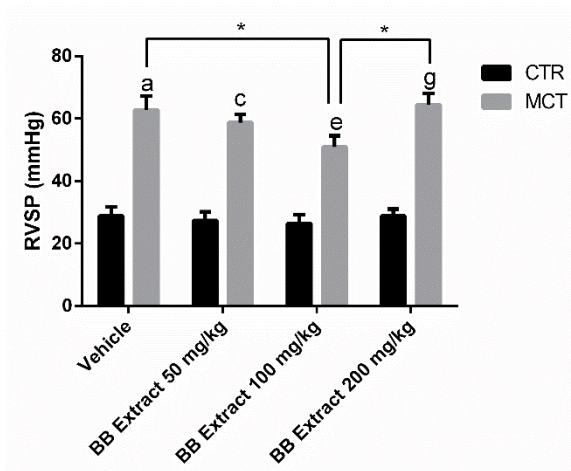
27  
28 [64] Souza-Rabbo MP, Silva LF, Auzani JA, Picoral M, Khaper N, Belló-Klein A. Effects  
29 of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular  
30 hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008; 35(8):  
31 944-8.

32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

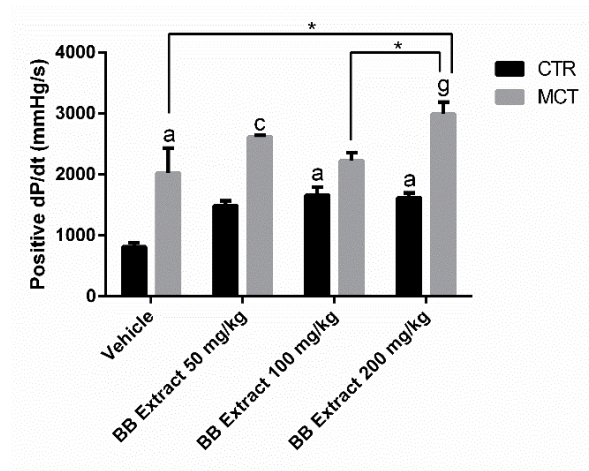


**Figure 1:** Effect of blueberry extract (BB) on (A) right ventricle/body mass (B) right ventricle/left ventricle mass and (C) right ventricle mass/tibia length in control rats (CTR) or with pulmonary arterial hypertension (MCT) treated by gavage for 35 days. Values represented as mean  $\pm$  standard deviation; For A and B) two-way ANOVA followed by Tukey's post-test. a- different from CTR Vehicle; b- different from MCT vehicle; c- different from CTR BB Extract 50 mg/kg; e- different from CTR BB Extract 100 mg/kg; g- different from CTR BB Extract 200 mg/kg; For C) Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-test. a- different from CTR; c- different from CTR + BB50; g- different from CTR + BB200. \* - difference between the indicated groups. CTR = Control; MCT = Monocrotaline; BB = Blueberry Extract.

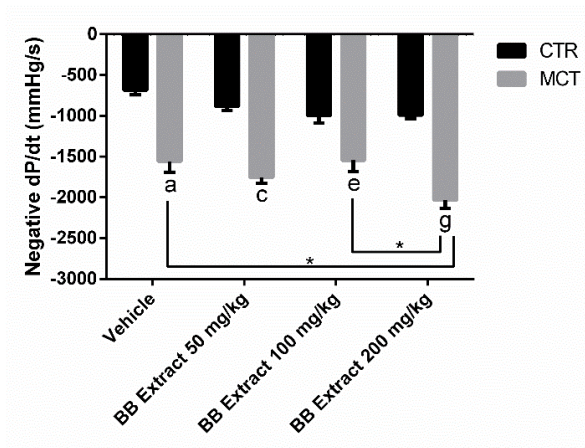
(A)



(B)

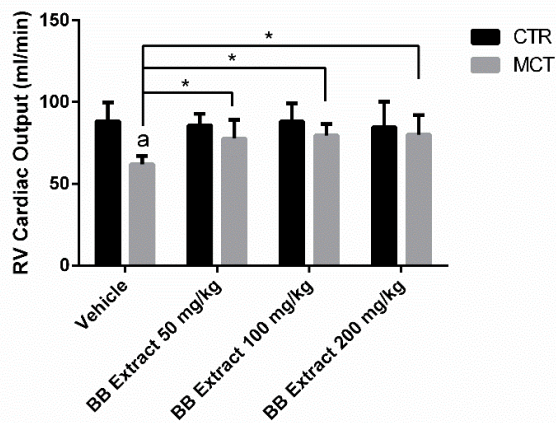


(C)

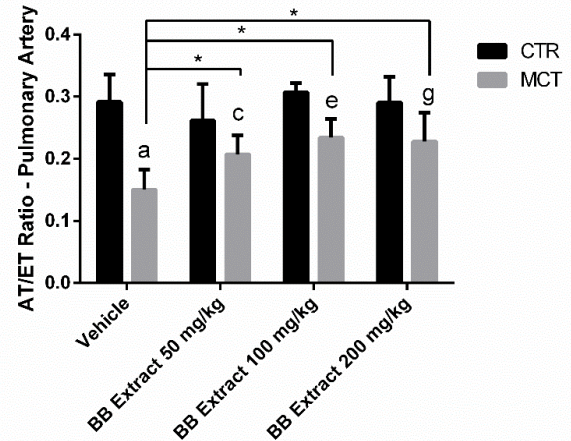


**Figure 2:** Effect of blueberry extract (BB) on (A) right ventricular systolic pressure (B) right ventricular contractility derivative and (C) right ventricular relaxation derivative in control rats (CTR) or with pulmonary arterial hypertension (MCT) treated by gavage for 35 days. Values represented as mean  $\pm$  standard deviation; ANOVA followed by Tukey's post-test. a- different from CTR Vehicle; c- different from CTR BB Extract 50 mg/kg; e- different from CTR BB Extract 100 mg/kg; g- different from CTR BB Extract 200 mg/kg; \* - difference between the indicated groups. CTR = Control; MCT = Monocrotaline; BB = Blueberry Extract.

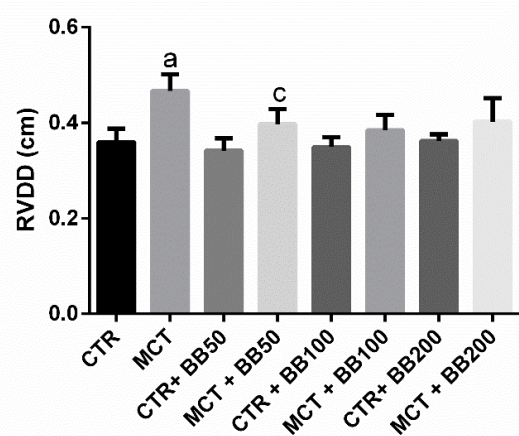
(A)



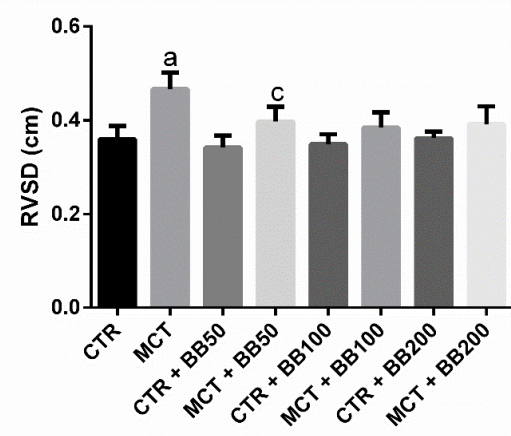
(B)



(C)

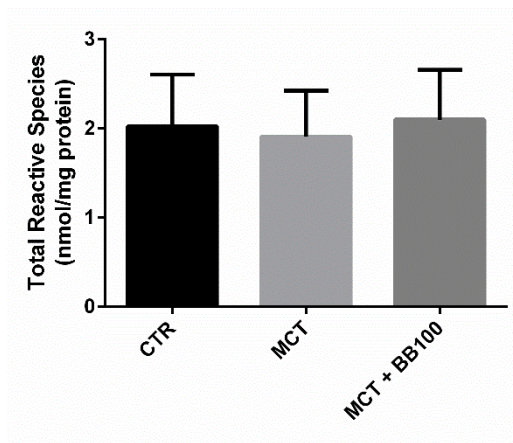


(D)

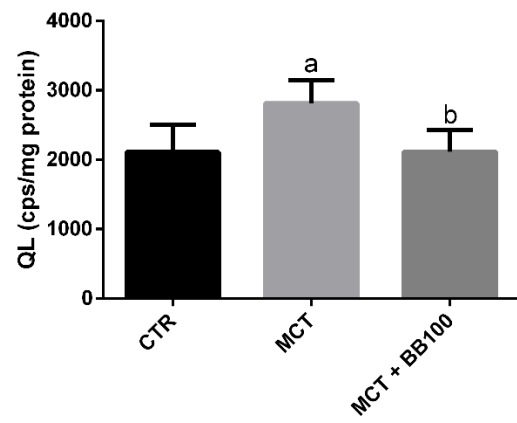


**Figure 3:** Effect of blueberry extract (BB) on (A) right ventricular output (B) acceleration/ejection time (AT/ET) ratio in pulmonary artery, (C) right ventricular diastolic diameter and (D) right ventricular systolic diameter in control rats (CTR) or with pulmonary arterial hypertension (MCT) treated by gavage for 35 days. Values represented as mean  $\pm$  standard deviation; For A and B) two-way ANOVA followed by Tukey's post-test. a- different from CTR Vehicle; c- different from CTR BB Extract 50 mg/kg; e- different from CTR BB Extract 100 mg/kg; g- different from CTR BB Extract 200 mg/kg; For C and D) Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-test. a- different from CTR; c- different from CTR + BB50. \* - difference between the indicated groups. CTR = Control; MCT = Monocrotaline; BB = Blueberry Extract; AT = acceleration time; ET = ejection time; RVDD = right ventricular diastolic diameter; RVSD = right ventricular systolic diameter.

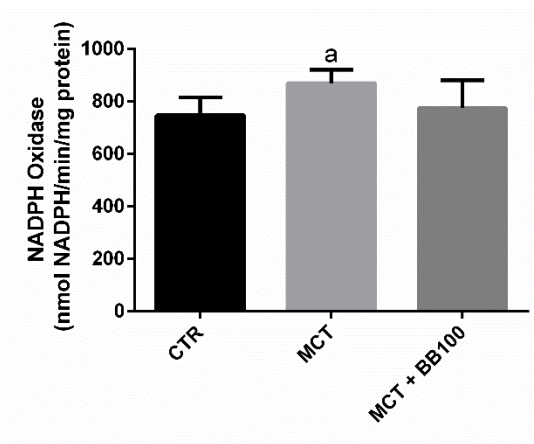
(A)



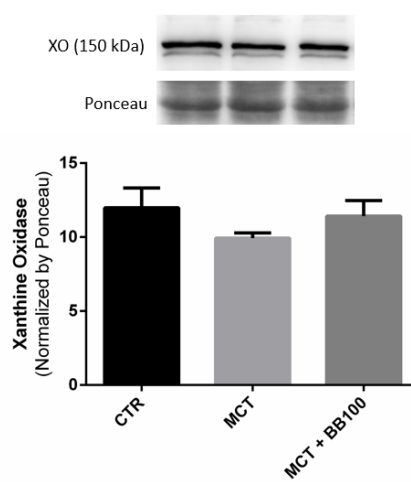
(B)



(C)

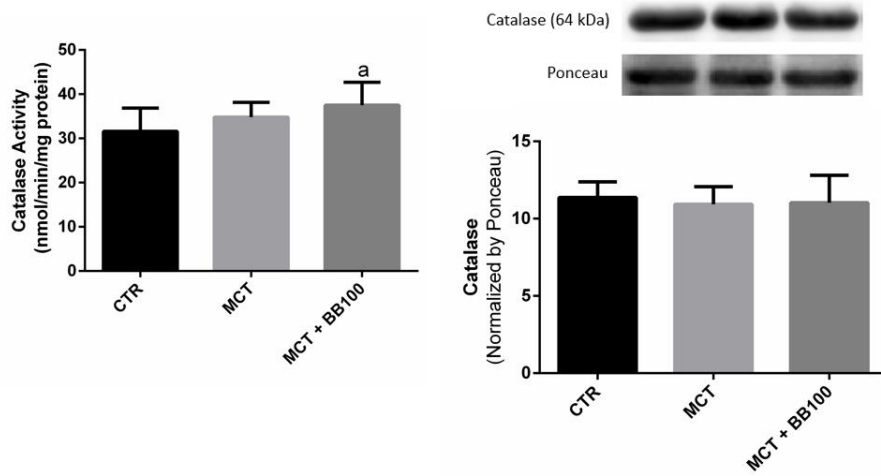


(D)

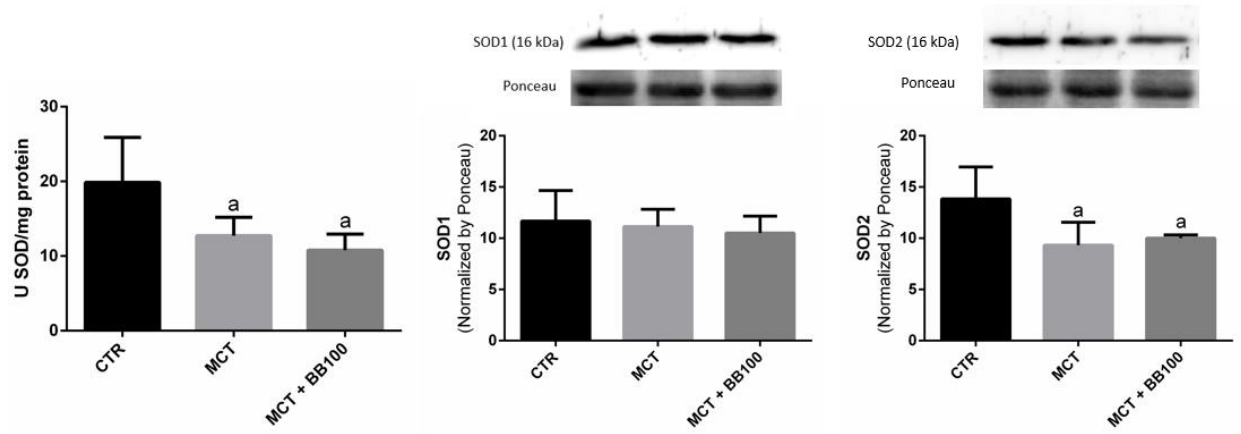


**Figure 4:** Effect of blueberry extract (BB) on right ventricular (A) total reactive species (B) lipid oxidation (C) NADPH oxidase activity (D) xanthine oxidase immunoreactivity in control rats (CTR) or with pulmonary arterial hypertension (MCT) treated with 100 mg/kg/day of BB by gavage for 35 days. Values represented as mean  $\pm$  standard deviation; one-way ANOVA followed by Tukey's post-test. a- different from CTR; b- different from MCT. CTR = Control; MCT = Monocrotaline; BB = Blueberry Extract; QL = chemiluminescence.

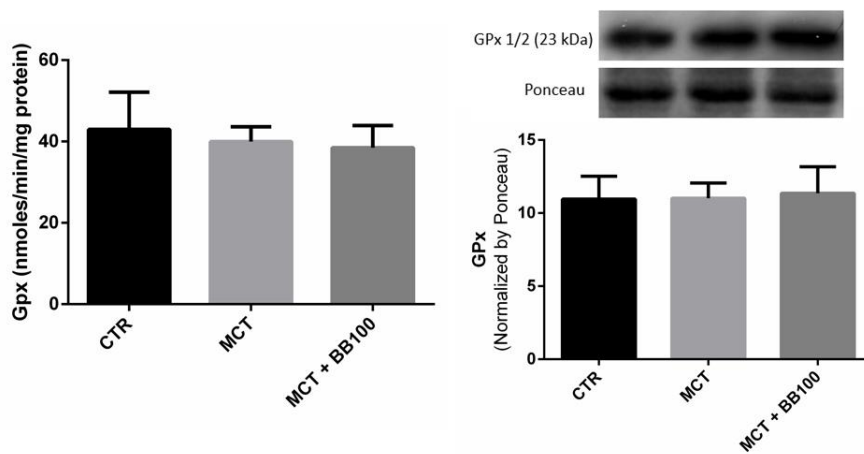
(A)



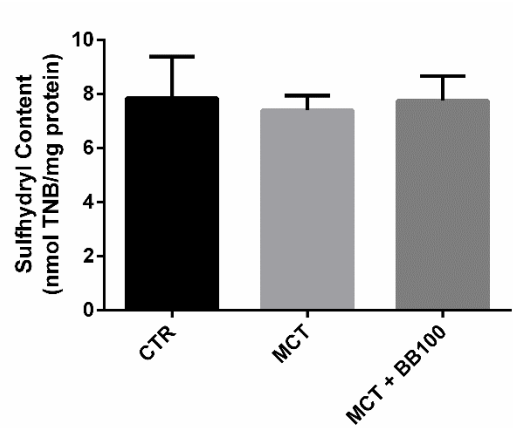
(B)



(C)

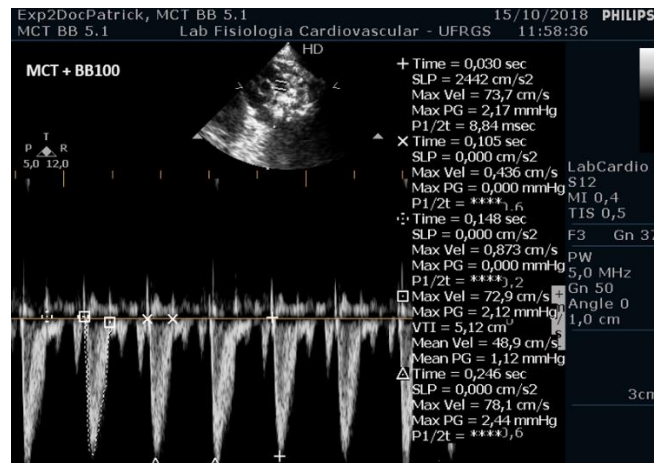
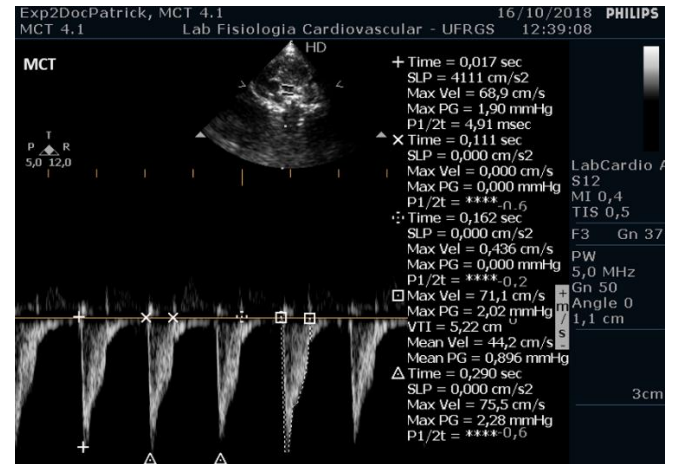
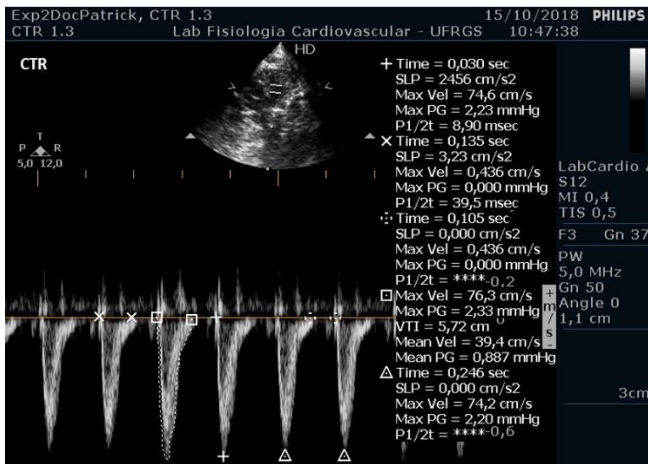


(D)



**Figure 5:** Effect of blueberry extract (BB) on (A) catalase activity and immunocontent; (B) superoxide dismutase activity and immunocontent; (C) glutathione peroxidase activity and immunocontent and (D) sulfhydryl content in control rats (CTR) or with pulmonary arterial hypertension (MCT) treated with 100 mg/kg/day of BB by gavage for 35 days. Values represented as mean  $\pm$  standard deviation; one-way ANOVA followed by Tukey's post-test. a- different from CTR; MCT = Monocrotaline; BB = Blueberry Extract; SOD = superoxide dismutase; GPx = glutathione peroxidase.

## Supplemental Material



**Sup 1.** Representative images of doppler echocardiography of pulmonary artery outflow tract in the different experimental groups.



## CAPÍTULO III

### 4.3 Extrato de mirtilo atenua o estresse oxidativo e a apoptose induzidos por noradrenalina em células cardíacas H9c2.

Neste capítulo verificamos os efeitos benéficos do extrato de mirtilo em células cardíacas H9c2 em um ambiente de estresse oxidativo induzido pela presença de noradrenalina, mimetizando uma condição que afeta o VD na HAP. Buscamos não só analisar os efeitos do extrato sobre a produção de espécies oxidantes e sobre as defesas antioxidantes, mas também estudar vias de sinalização envolvidas nesses processos e em mecanismos de morte/sobrevivência celular.

**Artigo submetido para a revista Journal of Nutritional Biochemistry (Elsevier):**

TÜRCK P. *et al.* *Blueberry extract attenuates norepinephrine-induced oxidative stress and apoptosis of H9c2 cardiac cells.*

## Manuscript Details

<b>Manuscript number</b>	JNB_2019_1002
<b>Title</b>	Blueberry extract attenuates norepinephrine-induced oxidative stress and apoptosis of H9c2 cardiac cells
<b>Article type</b>	Research Paper

### Abstract

**BACKGROUND:** Enhanced sympathetic system activation mediated by norepinephrine (NE) contributes to adverse cardiac remodeling leading to oxidative stress and cell death, progressing to heart failure. Natural antioxidants may help maintain redox balance, attenuating NE-mediated cardiac cell damage. In the present study, we evaluated the effect of a blueberry extract (BBE) on H9c2 cardiac cells exposed to NE on cellular survival/death, oxidative stress status and its major signaling pathways. **METHOD:** H9c2 cells were pre-incubated with 50 µg/ml of BBE for 4h and maintained in the presence of 100 µM NE for 24h. Cell viability, caspase 3/7 activation, oxidative stress level and protein expression of antioxidant enzymes and redox signaling proteins were evaluated. **RESULTS:** NE exposure resulted in decreased cell viability and increased caspase 3/7 activity. This was associated with reduced protein expression of antioxidants catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase and increase in Nox2/gp91phox and 4-hydroxynonenal expression. NE led to increased activity of Protein kinase B (Akt), Forkhead box O3a (FoxO3a) and AMP-activated protein kinase alpha (AMPKα) and decreased activity of Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). BBE prevented caspases activation and abrogated NE-induced increases in oxidative stress, as well as attenuated the increase in Akt. BBE exposure further increased FoxO3a activity and restored STAT3 activity. Moreover, BBE increased mammalian target of rapamycin (mTOR) and p70S6 Kinase 1 activity. Based on these findings, BBE promoted cardioprotection of H9c2 cells in an in vitro model of NE-induced oxidative damage, suggesting a cardioprotective role for BBE in response to NE exposure.

<b>Keywords</b>	Blueberry Extract; Cardiac Remodeling; H9c2 cells; Redox Signaling; Norepinephrine
<b>Corresponding Author</b>	Neelam Khaper
<b>Corresponding Author's Institution</b>	Lakehead university
<b>Order of Authors</b>	Neelam Khaper, Patrick Türck, Ashley Nemec-Bakk, Tanu Talwar, Zach Suntres, Adriane Bello-Klein, Alex Sander da Rosa Araujo
<b>Suggested reviewers</b>	Madhu Anand-Srivastava, Grzegorz Sawicki, Dipayan Sarkar, Anita Sharma, Sanjiv Dhingra

## Submission Files Included in this PDF

### File Name [File Type]

NBiochemcoverletter.pdf [Cover Letter]

Highlights\_Manuscript\_PTJNB.docx [Highlights]

Blueberry\_Manuscript\_PT\_FinalJNB.docx [Manuscript File]

Figures-Blueberry\_Manuscript\_PT\_FinalJNB.docx [Figure]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

## Research Data Related to this Submission

There are no linked research data sets for this submission. The following reason is given:  
Data will be made available on request



Laurentian University  
935 Ramsey Lake Rd.  
Sudbury, ON  
P3E 2C6

Tel.: 1-705-675-4883  
Fax: 1-705-675-4858

Université Laurentienne  
935, chemin du lac Ramsey  
Sudbury, ON  
P3E 2C6

Tél.: 1-705-675-4883  
Télééc.: 1-705-675-4858

Lakehead University  
955 Oliver Rd.  
Thunder Bay, ON  
P7B 5E1

Tel.: 1-807-766-7300  
Fax: 1-807-766-7370

Lakehead University  
955, chemin Oliver  
Thunder Bay, ON  
P7B 5E1

Tél.: 1-807-766-7300  
Télééc.: 1-807-766-7370

[nosm.ca](http://nosm.ca)

November 11, 2019

Dr. Bernhard Hennig

University of Kentucky, Lexington, Kentucky

Editor-in-Chief : *The Journal of Nutritional Biochemistry*

Dear Dr. Hennig,

Re: **“Blueberry extract attenuates norepinephrine-induced oxidative stress and promotes survival of H9c2 cardiac cells”**

We are submitting the above mentioned original research article for consideration for publication in the *Journal of Nutritional Biochemistry*.

We believe that this work provides novel mechanistic insight into the protective role of blueberry extract in an *in vitro* norepinephrine exposure model. As per our knowledge this is the first study demonstrating a detailed mechanism underlying the cardioprotective effects of blueberry extract as demonstrated by markers of cell survival/cell death and redox signaling, which makes the search for nutritional alternatives that protect and preserve cardiac function quite relevant. We have demonstrated that norepinephrine increased apoptosis and reactive oxygen species in cardiac cells and the blueberry extract was able to attenuate the damaging effects of norepinephrine by modulating redox and cell survival/death signaling pathways.

This manuscript fits within the scope of your journal as our study focuses on the potential role of food extracts in cardiac pathophysiology settings.

We confirm that this work is not being considered, in whole or in part, for publication elsewhere. All the authors have read and approved the manuscript's content. None of the authors have financial or other relations that could lead to a conflict of interest.

We sincerely hope that you will find our manuscript suitable for publication in your journal.

Thank you for your attention to our manuscript.

Sincerely,

Dr. Neelam Khaper

Associate Professor-Physiology

Northern Ontario School of Medicine, Lakehead University

Thunder Bay, ON, CANADA

[nkhaper@nosm.ca](mailto:nkhaper@nosm.ca)

CELEBRATING 10 YEARS WITH THANKS.

**NOSM**  
THANK YOU | MERCI | MIIGWETCH

Innovative education and research for a healthier North.  
Formation et recherche novatrices pour l'amélioration de la santé dans le Nord.

# **Blueberry extract attenuates norepinephrine-induced oxidative stress and promotes survival of H9c2 cardiac cells**

Patrick Türck<sup>1</sup>, Ashley Nemec-Bakk<sup>2</sup>, Tanu Talwar<sup>3</sup>, Zacharias Suntres<sup>3</sup>, Adriane Belló-Klein<sup>1</sup>, Alex Sander da Rosa Araujo<sup>1</sup>, Neelam Khaper<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

<sup>2</sup>Biotechnology Program, Lakehead University, Thunder Bay, Ontario, Canada

<sup>3</sup>Northern Ontario School of Medicine, Lakehead University, Thunder Bay, Ontario, Canada.

\*Corresponding author

Dr. Neelam Khaper

Medical Sciences Division, Northern Ontario School of Medicine

Lakehead University

955 Oliver Rd, Thunder Bay, ON, CANADA, P7B 5E1

Email: [nkhaper@nosm.ca](mailto:nkhaper@nosm.ca)

Phone: +1-807-766-7374; Fax: +1-807-766-7362

## **ABSTRACT**

**BACKGROUND:** Enhanced sympathetic system activation mediated by norepinephrine (NE) contributes to adverse cardiac remodeling leading to oxidative stress and cell death, progressing to heart failure. Natural antioxidants may help maintain redox balance, attenuating NE-mediated cardiac cell damage. In our study, we evaluated the effect of a blueberry extract (BBE) on H9c2 cardiac cells exposed to NE on cellular survival/death, oxidative stress status and its major signaling pathways.

**METHOD:** H9c2 cells were pre-incubated with 50 µg/ml of BBE for 4h and maintained in the presence of 100 µM NE for 24h. Cell viability, caspase 3/7 activation, oxidative stress level and protein expression of antioxidant enzymes and redox signaling proteins were evaluated. **RESULTS:** NE exposure resulted in decreased cell viability and increased activation of caspase 3/7. This was associated with reduced protein expression of antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase and increase in Nox2/gp91phox and 4-hydroxynonenal expression. NE led to increased expression of Protein kinase B (Akt), Forkhead box O3a (FoxO3a) and AMP-activated protein kinase alpha (AMPK $\alpha$ ) and decreased protein expression of Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). BBE prevented caspases activation and abrogated NE-induced increases in oxidative stress, as well as attenuated Akt increase, it further increased FoxO3a expression and restored STAT3 expression. Moreover, BBE increased mammalian target of rapamycin (mTOR) and p70S6 Kinase 1 expression. Based on these findings, BBE promoted protection of H9c2 cells in an *in vitro* model of NE-induced oxidative damage, suggesting a cardioprotective role for BBE in response to NE exposure.

**KEYWORDS:** Blueberry; Natural Products; Cardiac Protection; H9c2; Redox Signaling; Norepinephrine

## 1. INTRODUCTION

Heart failure (HF) is one of the major causes of mortality worldwide and is characterized by impaired cardiac contractility and eventually leading to inadequate tissue perfusion [1]. In HF, there is an early adaptive activation of the neurohumoral system intended to compensate for the depressed myocardial function [2]. However, chronic overactivation of the sympathetic system impacts cardiovascular function, causing adverse cardiac remodeling and mechanical dysfunction, which contribute to HF progression [3]. In this regard, the widespread use of  $\beta$ -adrenergic receptor ( $\beta$ -AR) blockers as a primary therapy in HF, by reducing the increased sympathetic drive to the heart has resulted in reduced risk of hospitalization and improved survival [4].

The adrenergic system plays a pivotal role in stress signaling which is often associated with increased production of reactive oxygen species (ROS) due to elevated cellular metabolism and mitochondrial oxygen consumption [5-7]. Increased ROS can cause mitochondrial cytochrome c release in cardiac myocytes, thus contributing to norepinephrine mediated cardiomyocytes death via caspase activation [8]. Use of antioxidants, such as superoxide dismutase and catalase mimetics, have been reported to inhibit  $\beta$ AR stimulation related apoptosis [7].

Most plants have endogenous protective mechanisms for detoxification of free radicals, which are produced during normal metabolic processes [9]. Specifically, small berries show high levels of antioxidants with blueberries (BB) (*Vaccinium spp.*) having one of the highest antioxidant capacities between the fruits and vegetables tested to date, containing anthocyanins, pro-anthocyanidins, phenolic acids and flavonols [10]. BB is reported to have cardioprotective properties, related to its antioxidant content [11,12]. Treatment with BB has been demonstrated to reduce cardiac hypertrophy and attenuate the reduction in left ventricular ejection fraction in cyclophosphamide exposed animals,

which was associated with an improvement in redox balance [13]. BB supplementation also attenuated myocardial infarction expansion in rats, promoting functional recovery [14].

Therefore, the present study was undertaken to examine the potential role of BB in modulating redox homeostasis and regulate cellular death in an *in vitro* model of H9c2 cardiac cells exposed to norepinephrine.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Reagents**

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - High Glucose and norepinephrine were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Fetal Bovine Serum (FBS), Trypsin 0.05 % and Antibiotic–antimycotic (10,000 units/mL of penicillin, 10,000 µg/mL of streptomycin, 25 µg/mL of Fungizone) were purchased from Thermo Fisher (Waltham, MA, USA). Blueberry Extract (BBE) (*Vaccinium myrtillus* L.) was purchased from Active Pharmaceutica (Palhoça, SC, Brazil). Its preparation and its main constituents were described previously [15].

Primary antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA): rabbit polyclonal anti-Bax (1:250); from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA): rabbit polyclonal anti-Caspase-3 (1:1000), rabbit polyclonal anti-phospho-Akt (Ser<sup>473</sup>) (1:1000), rabbit polyclonal anti-Akt (1:500), mouse polyclonal anti-phospho-STAT3 (Tyr<sup>705</sup>) (1:1000), rabbit polyclonal anti-STAT3 (1:1000), rabbit monoclonal anti-phospho-AMPK $\alpha$  (Thr<sup>172</sup>) (1:500), rabbit monoclonal anti-AMPK $\alpha$  (1:1000), rabbit polyclonal anti-phospho-FoxO3a (Ser<sup>253</sup>) (1:1000), rabbit monoclonal anti-FoxO3a (1:500); from Abcam: rabbit polyclonal anti-Catalase (1:1000), rabbit polyclonal anti-Glutathione Peroxidase 1 (1:500), rabbit polyclonal anti-

NOX2/gp91phox (1:250); from Millipore: rabbit polyclonal anti-Mn-Superoxide Dismutase (1:1000). Secondary mouse monoclonal anti- $\beta$ -Actin antibody (1:5000) was purchased from Santa Cruz Biotechnology.

## 2.2 Blueberry Extract (BBE)

BBE (*Vaccinium myrtillus* L.) preparation and its main constituents were described previously [15]. Analysis of total phenolic compounds showed a concentration of 179.46 mg equivalents gallic acid/g extract. Total flavonoids accounted for 46.56 equivalents of quercetin/g extract. Cyanidin-3-O-glucoside, petunidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside and malvidin-3-O-glucoside were identified and quantified.

## 2.3 Cell Culture and Treatments

Rat cardiac myoblast cells (H9c2) (American Type Culture Collection (VA, USA) were cultivated in T25 (25 cm<sup>2</sup> surface area) and T75 (75 cm<sup>2</sup> surface area) cell culture flasks in high-glucose DMEM supplemented with 10 % FBS and 1 % antibiotic–antimycotic and incubated at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub> and 100 % humidity. Medium was changed every 2- to 3-days and cells were trypsinized and seeded in new flasks when they reached ~80 % confluence to maintain cardiac cells characteristics. For experimental protocols, cells were seeded at 1 x 10<sup>4</sup> cells/well for MTT assay and 2 x 10<sup>5</sup> cells/T-25 for flow cytometry analysis. Cells were allowed to adhere 24h prior to the experiments.

The following experimental groups were established: **Control** – cells exposed to serum-free DMEM for 4h; medium changed to serum-free DMEM for 24h; **BBE** - cells pre-treated with 50  $\mu$ g/ml BBE in serum-free DMEM for 4h; medium changed to serum-free DMEM for 24h; **NE** - cells exposed to serum-free DMEM for 4h; medium



changed to serum-free DMEM in the presence of 100  $\mu$ M norepinephrine (NE) for 24h; **BBE+NE** – cells pre-treated with 50  $\mu$ g/ml BBE in serum-free DMEM for 4h; medium changed to serum-free DMEM in the presence of 100  $\mu$ M norepinephrine (NE) for 24h. These concentrations were chosen based on cellular viability data (MTT assay) and active caspases 3/7 assay (CaspasTag, Chemicon, Temecula, CA, USA).

#### **2.4 Cell Viability Determination**

Viability of H9c2 cells was determined by MTT [3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay. Cells were seeded in a 96-well microplate and after 20h in the presence or absence of 100 mM NE, MTT solution (10 % v/v) was added to each well. Cells were incubated at 37°C for 4h, then media was removed and 50  $\mu$ L of DMSO (dimethyl sulfoxide) was added to each well. The microplate was placed on shaker for 10 min in the dark and cellular viability was determined measuring the absorbance at 490 nm (650 nm as reference) using a microplate reader (Powerwave XS, Biotek, Winooski, VT, USA).

#### **2.5 Analysis of Apoptosis**

Apoptosis was determined using the CaspasTag Caspase-3/7 Assay Kit (Chemicon, Temecula, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Active caspase-3/7 positive cells were assessed by flow cytometry (Becton Dickinson FACScalibur, BD Flow Cytometer, Franklin Lakes, NJ, USA) based on the fluorescence in the presence of Fluorochrome Inhibitors of Caspases (FLICA) [16]. Data were expressed as mean fluorescence intensity.

#### **2.6 Measurement of Total Reactive Oxygen Species Levels**

Total reactive oxygen species (ROS) levels were measured using 2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA Assay, Life Technologies, Carlsbad, CA,

USA). H<sub>2</sub>DCFH-DA is membrane permeable compound that is rapidly oxidized to the highly fluorescent 2,7-dichlorofluorescein (DCF) in the presence of intracellular ROS. After 24h in the presence or absence of 100 mM NE, cells were washed with phosphate buffer saline (PBS) and incubated for 30 minutes with H<sub>2</sub>DCFDA according to the manufacturer's instructions. The H<sub>2</sub>DCFDA was then aspirated and the cells were washed with PBS. The cells were then carefully removed from the culture dish by trypsinization and the relative fluorescence of cells was measured via flow cytometry (Becton Dickinson FACScalibur, BD Flow Cytometer, Franklin Lakes, NJ, USA) as per the manufacturer's instructions.

## **2.7 Western Blotting**

Immunocontent of proteins was analyzed by Western Blot. H9c2 cells cultured in T75 flasks showing ~80 % confluence after 24h in the presence or absence of NE and trypsinized, harvested and centrifuged at 500 g for 5 minutes at 4 °C. Supernatant was discarded and cells were washed with PBS twice. 200 µL of lysis buffer (150 mM NaCl, 25 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 (v/v) and protease inhibitors phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF), leupeptin, aprotinin and pepstatin). pipetted up/down repeatedly were used to lyse cells. Cell debris was removed by centrifugation at 8000xg for 10 minutes at 4 °C, and the protein content was determined by DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Thirty (30) µg of protein from each sample was boiled and subjected to electrophoresis in denaturing 8–14 % SDS-PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes using a Bio-Rad Trans-Blot apparatus. Membranes were blocked with 5% non-fat milk in Tris Buffered Saline (TBS - 20 mmol/L Tris, 137 mmol/L NaCl) for 1 h at room temperature and then incubated with primary antibodies overnight at 4° C. Primary antibodies were removed and membranes were washed 3

times with TBST for 5 minutes. Membranes were incubated with (HRP)-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies for 1 hour at room temperature. Finally, secondary antibody was removed, membranes were washed 3 times with TBST for 5 minutes and developed using chemiluminescent reagent. Images were obtained in QuantityOne program using a Bio-Rad Gel Doc. Data were expressed as mean of optical densities analyzed in the software ImageJ 1.47t (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) normalized to  $\beta$ -actin loading control.

## **2.8 Statistical Analysis**

Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Data were subjected to the normality test (Shapiro-Wilk). Parametric results' comparison was made through a two-way ANOVA, complemented with the Tukey post-test to detect differences between groups. The differences were considered significant when the statistical analysis showed  $p < 0.05$ . GraphPad InStat 6.01 for Windows (GraphPad Software Inc, CA, USA) was used as a tool for data analysis.

## **3. RESULTS**

### **3.1 Cell Viability**

Exposure of control cells to 200  $\mu$ M and 400  $\mu$ M NE resulted in 16% and 49% decrease in cell viability, respectively, as compared to the control group. On the other hand, exposure of control cells to 100  $\mu$ M NE did not produce any significant changes to cell viability. Pre-treatment of cells with 50  $\mu$ g/ml BBE alone resulted in significant increase in cell viability (% of control). Also, exposure of BBE pretreated cells to 100  $\mu$ M and 200  $\mu$ M NE increased cell viability by 51% and 70% respectively as compared to control cells exposed to the same NE concentrations. However, BBE pretreatment did

not significantly protect against NE-induced decreases in cell viability in cells exposed to 400  $\mu$ M of NE (Figure 1).

### **3.2 Active Caspase 3/7**

Exposure of cells to 100  $\mu$ M NE led to an increase in active Caspase 3/7 levels compared to control cells which was prevented by prior BBE treatment (Figure 2A). Moreover, protein expression of Caspase-3 was significantly higher in 100  $\mu$ M NE group compared to control. Similarly, pre-treatment with 50  $\mu$ g/ml BBE maintained caspase-3 expression back at control levels (Figure 2). Based on the data from cell viability and caspases activation, the concentrations of 100  $\mu$ M NE and 50  $\mu$ g/ml BBE were used for all subsequent experiments.

### **3.3 Oxidative stress and antioxidant enzyme protein expression**

Exposure of cells to 100  $\mu$ M NE increased the indices of oxidative stress as demonstrated by the levels of total reactive oxygens species (ROS) albeit not statistically significant(Figure 3) and 4-HNE protein adduct formation (4-HNE protein expression as an indicator of lipid oxidation was 28% higher in NE group compared to control) (Figure 4). Pre-treatment of cells with BBE lowered the intracellular levels of ROS in NE-exposed cells and at the same time prevented the formation of 4-HNE protein adducts.

Mn-SOD, which dismutates  $O_2^-$  radical, showed a decreased expression (24%) in NE compared to the control group. On the other hand, pre-treatment with BBE maintained Mn-SOD protein levels near control levels. Protein expression of GPx, which is responsible for the reduction of  $H_2O_2$  and lipid hydroperoxides to water, was decreased (57%) in NE compared to control group and maintained at control levels in BBE

pretreated cells. Catalase, which decomposes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to oxygen and water, was decreased (53%) in NE-treated cells compared to control; BBE pretreatment attenuated the decrease in its expression. NADPH oxidase (Nox2), an enzyme associated with generation of O<sub>2</sub><sup>-</sup> radical, exhibited a higher expression (47%) in NE group compared to control. BBE presence prior to NE exposure abrogated this increase (Figure 5).

### ***Redox Signaling Pathways***

#### ***AKT/FoxO3a***

FoxO proteins are a family of transcription factors that play an important role in regulating genes involved in oxidative stress resistance, promoting cardiomyocytes survival [17]. We investigated whether FoxO3a is involved in the redox modulation upon NE exposure. Exposure to NE increased p-FoxO3a (Ser<sup>253</sup>)/Total FoxO3a ratio (35%) compared to control. Interestingly, BBE pre-treatment increased its level even further (135%) compared to control. FoxO can be inhibited by AKT, which blunt the activation of genes related to antioxidant response [18]. p-AKT (Ser<sup>473</sup>)/Total AKT ratio was increased (113%) in cells exposed to NE compared to control. BBE pre-treatment before NE exposure attenuated this increase (64%) in comparison to NE (Figure 6).

#### ***STAT3 and AMPK $\alpha$***

Another transcription factor that protects cardiac myocytes from oxidative stress is STAT3 [19]. STAT3 activation inhibits caspase-3 activation and regulates transcription of pro-survival genes, such as Bcl-2 and Bcl-XL [20]. AMPK $\alpha$ , which is known to be activated by oxidative stress and is an import regulator of STAT3 phosphorylation, can modulate several signaling pathways involved in redox homeostasis [21, 22]. Therefore, we decided to evaluate expression of these proteins. Exposure of H9c2 cells to NE led to a 48% decrease in p-STAT3 (Tyr<sup>705</sup>)/Total STAT3 compared to control, while BBE

pre-treatment attenuated this reduction. NE caused a 52% increase in p-AMPK $\alpha$  (Thr<sup>172</sup>)/Total AMPK $\alpha$  compared to control and BBE pre-treatment did not alter its activity (Figure 7).

Considering that AMPK $\alpha$  has also an important involvement in mTOR/p70S6K signaling [23], it led us to investigate whether its pronounced expression would modulate this pathway.

### ***mTOR/p70S6K***

mTOR signaling regulates cardiac metabolism, including cardiomyocytes autophagy activation, and higher mTOR/p70S6K signaling pathway stimulation is suggested to be responsible for increased survival in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [24]. Exposure of cells to NE resulted in unchanged p-mTOR (Ser<sup>2448</sup>)/mTOR and p-p70S6K(Thr<sup>389</sup>)/p70S6K expression. On the other hand, BBE pre-treatment caused an increase in both proteins (21% and 58%, respectively) compared to non-treated groups (Figure 8), indicating that mTOR/p70S6K signaling activation could be involved in attenuating cell death and ROS accumulation.

## **4. DISCUSSION**

Enhanced sympathetic nervous system activation mediated by NE, although beneficial in the early stages of HF in helping to maintain cardiac output, eventually contributes to the progression of HF. The chronic increase in sympathetic activity is associated with structural and functional changes in the heart leading to cardiac remodeling such as oxidative stress and cardiomyocytes apoptosis [3, 25]. Numerous studies have reported the relationship between consumption of small berries rich in polyphenols, and reduced cardiovascular disease related risks [14, 26]. We aimed to evaluate the effect of a BBE on cardiac cells exposed to NE by measuring markers of apoptosis and oxidative stress.

In the present study we showed that treatment of cardiac cells with BBE prior to NE exposure modulates redox signaling pathways by mitigating oxidative stress and resulting in decreased cell death.

Cell viability data showed that the selected BBE concentration (50 µg/ml) was not cytotoxic to H9c2 cells. Other studies have also reported that BBE prevented the decrease in cell viability when exposed to oxidative stimuli [26, 27], ratifying our choice for the dose used in the study.

Several pathways are implicated in cardiac damage associated with catecholamines overstimulation, including the activation of caspases leading to apoptosis [28-30]. Upregulation of proinflammatory cytokine production is involved in NE-induced cardiomyocytes apoptosis [31]. In fact, NE led to increased caspase 3/7 activities and caspase-3 protein expression in H9c2 cells, and BBE pre-treatment prevented this increase in caspase 3/7 activity and caspase 3 protein expression.

Growing evidence demonstrate that ROS may mediate cardiomyocyte apoptosis subsequent to NE administration. Moreover, chronic norepinephrine stimulation impairs the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense systems, such as decreasing catalase activity and redox ratio [32] thereby triggering cardiac oxidative stress, which is an important factor in the pathogenesis of catecholamines-induced cardiotoxicity. Based on the findings of this study, NE elevated lipid oxidation as demonstrated by an increase in 4-HNE expression. 4-HNE forms adducts with protein leading to cell damage and cardiac dysfunction contributing to impaired cardiac contractility and promoting myocytes apoptosis, and cardiac dysfunction [33, 34]. We also showed that NE blunted the protein expression of the enzymatic antioxidants (catalase, Mn-SOD and Gpx1) and increased NADPH oxidase subunit gp91<sup>phox</sup> (Nox2) protein expression, a

prominent source of superoxide anion. Collectively these data are consistent with the findings of other studies examining the role of NE in disrupting the redox balance and inducing cardiac cell death [35, 36].

Blueberry extracts have been shown to attenuate cell death, mainly through modulating the antioxidant system [37, 38]. Louis et al. [26] reported the use of a blueberry phenolic fraction to restore catalase and SOD activities, prevent contractile loss, hypertrophy and cell death as well as inhibit calpain activation in rat cardiomyocytes exposed to NE. Our data demonstrated that BBE indeed protected H9c2 cells by maintaining antioxidant protein expression, further decreasing gp91<sup>phox</sup> and 4-HNE levels. Accordingly, our study suggests that BBE protects cardiac cells against oxidative stress and promotes cell survival.

Despite previous studies showing cardioprotective effects of blueberry via modulation of oxidative stress, there is lack of information regarding the signaling pathways involved. Hence, we investigated the redox signaling and apoptosis pathways. FoxO3a is a fundamental transcription factor responsible for mediating resistance to oxidative stress in various conditions [39, 40]. Sengupta et al. [17] reported that FoxO3a plays a crucial role in promoting cardiomyocyte cell survival in response to oxidative stress stimuli. Combined loss of FoxO1 and FoxO3 in mice cardiomyocytes led to increased oxidative stress and reduced antioxidant reserve, resulting in adverse ventricular remodeling and cardiac dysfunction after ischemic injury [17]. We showed that NE increased FoxO3a activity and, interestingly, BBE increased it further. Upregulation of FoxO3a may occur as an attempt to protect H9c2 cells from oxidative damage induced by NE, which was more prominent in the presence of BBE. Akt-induced FoxO phosphorylation results in FoxO inactivation and nuclear exclusion, resulting in attenuation of FoxO-dependent expression of genes like those coding for antioxidant



enzymes [41]. In fact, NE increased AKT activity and BBE attenuated it, which is in agreement with results observed for FoxO3a.

Data in the literature report the role of STAT3 in regulating the subcellular localization of FoxO, as well as promoting FoxO3a transcription [42 – 44]. Moreover, STAT3 inhibits caspase-3 activation and regulates transcription of pro-survival genes, such as Bcl-2 and Bcl-XL [20]. NE decreased p-STAT3 (Tyr<sup>705</sup>)/Total STAT3 expression, an effect that was nullified by BBE. Moreover, increase in STAT3 expression could account for protection against oxidative stress via Ref-1 modulation and decreased mitochondrial ROS production, contributing to the improvement in redox status observed by BBE pre-treatment [45, 46]. Furthermore, it has been reported that STAT3 can be phosphorylated and activated by AMPK $\alpha$ , leading to suppression of inflammatory cytokines production in macrophages [21]. Interestingly, AMPK $\alpha$  expression was higher in NE-exposed group, while pre-treatment with BBE did not modify it. Thus, decreased STAT3 phosphorylation in H9c2 cells induced by NE seems to be not due to AMPK $\alpha$  impairment, but through different signaling pathways. Nevertheless, modifications in AMPK $\alpha$  content could influence other cellular mechanisms, such as survival/death via mTOR/p70S6K signaling [22].

mTOR/p70S6K activation usually occurs in response to growth stimuli or adrenergic agonists, such as NE, and leads to protein synthesis and inhibition of protein and organelle degradation [47]. Nevertheless, the role of mTOR/p70S6K role in cardiac remodeling is still not completely understood. Several studies have demonstrated that this pathway is linked to cardiac hypertrophy and that rapamycin treatment blunted the development of pressure overload induced hypertrophy [48]. However, inactivation of mTOR in mice led to reduced ejection fractions and heart rate [49], as well as ablation of mTOR in the adult mouse myocardium resulted in a fatal, dilated cardiomyopathy

characterized by apoptosis, autophagy and altered mitochondrial structure [50]. In a condition of elevated oxidative stress, mTOR seems to be inhibited as a consequence of Akt inhibition or AMPK activation in neuronal cells [51], this last observed in NE treated cells. Blueberry extract, not only decreased Akt, but also decreased AMPK expression, which could explain enhanced mTOR/p70S6K activation. It is worth noting that increased mTOR/p70S6K expression could also be due to parallel pathways stimulated by BBE, as previously reported [52]. Data in the literature show that down-regulation of mTOR/p70S6K has been associated with cellular death [51, 53], while the presence of catalase or the antioxidant *N*-acetylcysteine can trigger mTOR/p70S6K and contribute to cell survival [24]. Accordingly, the potential of BBE to prevent mTOR/p70S6K decrease seems to be another pathway that contributed to increased cardiac cell viability when cells were challenged with NE.

We conclude that BBE could attenuate cardiac cell death caused by NE exposure by preventing ROS mediated damage and maintaining antioxidant enzymes. Blueberry extract exerted its effects via distinct pathways, such as Akt/FoxO3a, STAT3/AMPK and mTOR/p70S6K, which were also capable of modulating cellular redox balance and led to cardiac cell survival. In agreement with other studies, BBE exerted beneficial effects in a cardiac stress model [13,14], which could indicate its use in preventing cardiomyocytes damage and as an adjuvant in established cardiovascular conditions. Although further *in vivo* studies are necessary, our data support that fruits rich in antioxidants, such as BB, may confer cardiac protection in a setting of sympathetic system overactivation.

## **FUNDING**

This work was funded by the Brazilian National Council for Scientific Development (CNPq) and the Northern Ontario School of Medicine (NOSM) Faculty Association Research Development Funds.

## **AUTHORS CONTRIBUTION**

Data collection, analysis and writing the of first draft: Türck P. Design of the study and supervised the research: Khaper N, Belló-Klein A, Araujo A. Flow cytometry data acquisition and analysis: Türck P, Nemeč-Bakk A, Talwar T. Critical revision of the manuscript: Türck P, Khaper N, Belló-Klein A, Araujo A, Suntres Z. Primary investigator: Khaper N.

## **CONFLICT OF INTEREST**

None declared.

## **REFERENCES**

- [1] Lympelopoulos A, Rengo G, Koch WJ. The Adrenergic Nervous System in Heart Failure: Pathophysiology and Therapy. *Circ Res.* 2013;113(6):739-53.
- [2] Florea VG, Cohn JN. The Autonomic Nervous System and Heart Failure. *Circ Res.* 2014; 114:1815-1826.
- [3] Antoine S, Vaidya G, Imam H, Villarreal D. Pathophysiologic Mechanisms in Heart Failure: Role of the Sympathetic Nervous System. *Am J Med Sci.* 2017; 353(1):27-30.
- [4] May CN, Yao ST, Booth LC, Ramchandra R. Cardiac sympathoexcitation in heart failure. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 2013; 175(1-2):76-84.
- [5] Corbi G, Conti V, Russomanno G, Longobardi G, Furgi G, Filippelli A, Ferrara N. Adrenergic signaling and oxidative stress: a role for sirtuins? *Front Physiol.* 2013; 4:324.
- [6] Bovo E, Lipsius SL, Zima AV. Reactive oxygen species contribute to the development of arrhythmogenic Ca<sup>2+</sup> waves during  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation in rabbit cardiomyocytes. *J Physiol.* 2012; 590(14):3291-304.
- [7] Remondino A, Kwon SH, Communal C, Pimentel DR, Sawyer DB, Singh K, Colucci WS. Beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in cardiac myocytes is

mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of the mitochondrial pathway. *Circ Res.* 2003; 92(2):136-8.

[8] von Harsdorf R, Li PF, Dietz R. Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation.* 1999; 99(22):2934-41.

[9] Prior RL, Cao G, Prior RL, Cao G. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review. *J AOAC Int* 2000; 83(4):950-6.

[10] Elks CM, Reed SD, Mariappan N, Shukitt-Hale B, Joseph JA, Ingram DK, Francis J. A blueberry-enriched diet attenuates nephropathy in a rat model of hypertension via reduction in oxidative stress. *PLoS One* 2011; 6(9): e24028, 2011.

[11] Riso P, Klimis-Zacas D, Del Bo' C, Martini D, Campolo J, Vendrame S, Møller P, Loft S, De Maria R, Porrini M. Effect of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink intervention on markers of oxidative stress, inflammation and endothelial function in humans with cardiovascular risk factors. *Eur J Nutr.* 2013; 52(3):949-61.

[12] Basu A, Rhone M, Lyons TJ. Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutr Rev.* 2010; 68(3):168-77.

[13] Liu Y, Tan D, Shi L, Liu X, Zhang Y, Tong C, Song D, Hou M. Blueberry Anthocyanins-Enriched Extracts Attenuate Cyclophosphamide-Induced Cardiac Injury. *PLoS One* 2015; 10(7): e0127813, 2015.

[14] Ahmet I, Spangler E, Shukitt-Hale B, Joseph JA, Ingram DK, Talan M. Survival and cardioprotective benefits of long-term blueberry enriched diet in dilated cardiomyopathy following myocardial infarction in rats. *PLoS One.* 2009; 4(11):e7975.

[15] Türck P, Fraga S, Salvador I, Campos-Carraro C, Lacerda D, Bahr A, Ortiz V, Hickmann A, Koetz M, Belló-Klein A, Henriques A, Agostini F, Araujo AS. Blueberry extract decreases oxidative stress and improves functional parameters in lungs from rats with pulmonary arterial hypertension. *Nutrition.* 2019; [in press].  
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.110579>

[16] Darzynkiewicz Z, Pozarowski P, Lee BW, Johnson GL. Fluorochrome-labeled inhibitors of caspases: convenient in vitro and in vivo markers of apoptotic cells for cytometric analysis. *Methods Mol Biol.* 2011; 682:103-14.

[17] Sengupta A, Molkentin JD, Paik JH, DePinho RA, Yutzey KE. FoxO transcription factors promote cardiomyocyte survival upon induction of oxidative stress. *J Biol Chem.* 2011; 286(9):7468-78.

[18] Oellerich MF, Potente M. FOXOs and sirtuins in vascular growth, maintenance, and aging. *Circ Res.* 2012;110(9):1238-51.

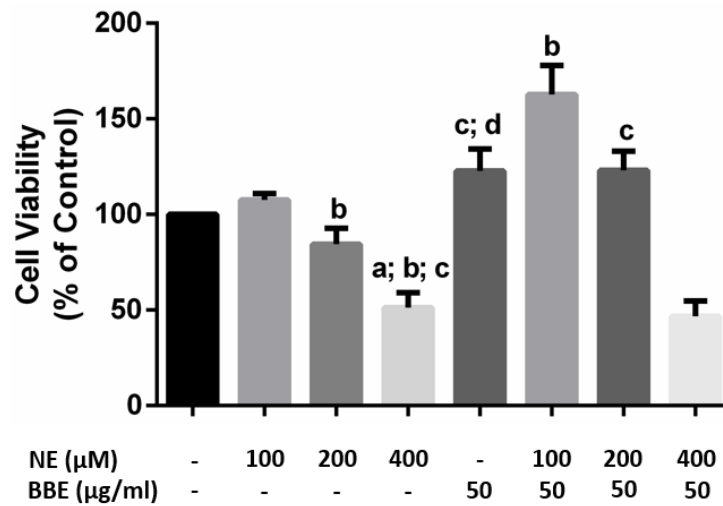
[19] Barry SP, Townsend PA, McCormick J, Knight RA, Scarabelli TM, Latchman DS, Stephanou A. STAT3 deletion sensitizes cells to oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 385(3):324-9.

[20] Ishii I, Harada Y, Kasahara T. Reprofile a classical anthelmintic, pyrvinium pamoate, as an anti-cancer drug targeting mitochondrial respiration. *Front Oncol.* 2012; 2:137.

- [21] Zhu YP, Brown JR, Sag D, Zhang L, Suttles J. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates IL-10-mediated anti-inflammatory signaling pathways in macrophages. *J Immunol*. 2015;194(2):584-94.
- [22] Sid B, Verrax J, Calderon PB. Role of AMPK activation in oxidative cell damage: Implications for alcohol-induced liver disease. *Biochem Pharmacol*. 2013; 86(2):200-9.
- [23] Zhao D, Yang J, Yang L. Insights for Oxidative Stress and mTOR Signaling in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury under Diabetes. *Oxid Med Cell Longev*. 2017:6437467.
- [24] Gutiérrez-Uzquiza Á, Arechederra M, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA, Porras A. p38 $\alpha$  mediates cell survival in response to oxidative stress via induction of antioxidant genes: effect on the p70S6K pathway. *J Biol Chem*. 2012;287(4):2632-42.
- [25] Brum PC, Rolim NP, Bacurau AV, Medeiros A. Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. *An Acad Bras Cienc*. 2006; 78(3):485-503.
- [26] Louis XL, Thandapilly SJ, Kalt W, Vinqvist-Tymchuk M, Aloud BM, Raj P, Yu L, Le H, Netticadan T. Blueberry polyphenols prevent cardiomyocyte death by preventing calpain activation and oxidative stress. *Food Funct*. 2014;5(8):1785-94.
- [27] Del Bo' C, Roursgaard M, Porrini M, Loft S, Møller P, Riso P. Different effects of anthocyanins and phenolic acids from wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) on monocytes adhesion to endothelial cells in a TNF- $\alpha$  stimulated proinflammatory environment. *Mol Nutr Food Res*. 2016; 60(11):2355-2366.
- [28] Fu YC, Chi CS, Yin SC, Hwang B, Chiu YT, Hsu SL. Norepinephrine induces apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes through a reactive oxygen species-TNF alpha-caspase signaling pathway. *Cardiovasc Res*. 2004; 62(3):558-67.
- [29] Mao W, Fukuoka S, Iwai C, Liu J, Sharma VK, Sheu SS, Fu M, Liang CS. Cardiomyocyte apoptosis in autoimmune cardiomyopathy: mediated via endoplasmic reticulum stress and exaggerated by norepinephrine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293(3):H1636-45.
- [30] Meeran MF, Jagadeesh GS, Selvaraj P. Synthetic catecholamine triggers  $\beta$ 1-adrenergic receptor activation and stimulates cardiotoxicity via oxidative stress mediated apoptotic cell death in rats: Abrogating action of thymol. *Chem Biol Interact*. 2016; 251:17-25.
- [31] Neri M, Cerretani D, Fiaschi AI, Laghi PF, Lazzerini PE, Maffione AB, Micheli L, Bruni G, Nencini C, Giorgi G, D'Errico S, Fiore C, Pomara C, Riezzo I, Turillazzi E, Fineschi V. Correlation between cardiac oxidative stress and myocardial pathology due to acute and chronic norepinephrine administration in rats. *J Cell Mol Med*. 2007; 11(1): 156-170.
- [32] Thakur A, Alam MJ, Ajayakumar MR, Ghaskadbi S, Sharma M, Goswami SK. Norepinephrine-induced apoptotic and hypertrophic responses in H9c2 cardiac myoblasts are characterized by different repertoire of reactive oxygen species generation. *Redox Biol*. 2015; 5:243-52.

- [33] Folden DV, Gupta A, Sharma AC, Li SY, Saari JT, Ren J. Malondialdehyde inhibits cardiac contractile function in ventricular myocytes via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Br J Pharmacol.* 2003; 139(7):1310-6.
- [34] Mali VR, Palaniyandi SS. Regulation and therapeutic strategies of 4-hydroxy-2-nenal metabolism in heart disease. *Free Radic Res.* 2014; 48(3):251-63.
- [35] Hare JM. Oxidative stress and apoptosis in heart failure progression. *Circ Res.* 2001; 89(3):198-200.
- [36] Kumar D, Lou H, Singal PK. Oxidative stress and apoptosis in heart dysfunction. *Herz.* 2002; 27(7):662-8.
- [37] Çoban J, Doğan-Ekici I, Aydın AF, Betül-Kalaz E, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. Blueberry treatment decreased D-galactose-induced oxidative stress and brain damage in rats. *Metab Brain Dis.* 2015; 30(3):793-802.
- [38] Huang WY, Wu H, Li DJ, Song JF, Xiao YD, Liu CQ, Zhou JZ, Sui ZQ. Protective Effects of Blueberry Anthocyanins against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Injuries in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *J Agric Food Chem.* 2018; 66(7):1638-1648.
- [39] Chiribau CB, Cheng L, Cucoranu IC, Yu YS, Clempus RE, Sorescu D. FOXO3A regulates peroxiredoxin III expression in human cardiac fibroblasts. *J Biol Chem.* 2008; 283(13):8211-7.
- [40] Morris BJ, Willcox DC, Donlon TA, Willcox BJ. FOXO3: A Major Gene for Human Longevity--A Mini-Review. *Gerontology.* 2015; 61(6):515-25.
- [41] Klotz LO, Sánchez-Ramos C, Prieto-Arroyo I, Urbánek P, Steinbrenner H, Monsalve M. Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol.* 2015; 6:51-72.
- [42] Oh HM, Yu CR, Dambuza I, Marrero B, Egwuagu CE. STAT3 protein interacts with Class O Forkhead transcription factors in the cytoplasm and regulates nuclear/cytoplasmic localization of FoxO1 and FoxO3a proteins in CD4(+) T cells. *J Biol Chem.* 2012; 287(36):30436-43.
- [43] Brault L, Gasser C, Bracher F, Huber K, Knapp S, Schwaller J. PIM serine/threonine kinases in the pathogenesis and therapy of hematologic malignancies and solid cancers. *Haematologica.* 2010; 95(6):1004-15
- [44] Shi Y, Zhang Z, Qu X, Zhu X, Zhao L, Wei R, Guo Q, Sun L, Yin X, Zhang Y, Li X. Roles of STAT3 in leukemia (Review). *Int J Oncol.* 2018; 53(1):7-20.
- [45] Haga S, Terui K, Zhang HQ, Enosawa S, Ogawa W, Inoue H, Okuyama T, Takeda K, Akira S, Ogino T, Irani K, Ozaki M. Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. *J Clin Invest.* 2003; 112(7):989-98.
- [46] Poli V, Camporeale A. STAT3-Mediated Metabolic Reprograming in Cellular Transformation and Implications for Drug Resistance. *Front Oncol.* 2015; 5:121.
- [47] Dorn GW 2nd, Force T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest.* 2005; 115(3):527-37.

- [48] McMullen JR, Sherwood MC, Tarnavski O, Zhang L, Dorfman AL, Shioi T, Izumo S. Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *Circulation*. 2004; 109(24):3050-5.
- [49] W.H. Shen, Z. Chen, S. Shi, H. Chen, W. Zhu, A. Penner, G. Bu, W. Li, D.W. Boyle, M. Rubart, L.J. Field, R. Abraham, E.A. Liechty, W. Shou. Cardiac restricted overexpression of kinase-dead mammalian target of rapamycin (mTOR) mutant impairs the mTOR-mediated signaling and cardiac function. *J. Biol. Chem*. 2008; 283:13842-13849.
- [50] Zhang D, Contu R, Latronico MV, Zhang J, Rizzi R, Catalucci D, Miyamoto S, Huang K, Ceci M, Gu Y, Dalton ND, Peterson KL, Guan KL, Brown JH, Chen J, Sonenberg N, Condorelli G. MTORC1 regulates cardiac function and myocyte survival through 4E-BP1 inhibition in mice. *J Clin Invest*. 2010; 120(8):2805-16.
- [51] Chen L, Xu B, Liu L, Luo Y, Yin J, Zhou H, Chen W, Shen T, Han X, Huang S. Hydrogen peroxide inhibits mTOR signaling by activation of AMPK alpha leading to apoptosis of neuronal cells. *Lab Invest*. 2010; 90(5):762-73.
- [52] Williams CM, El Mohsen MA, Vauzour D, Rendeiro C, Butler LT, Ellis JA, Whiteman M, Spencer JP. Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Free Radic Biol Med*. 2008; 45(3):295-305.
- [53] Cao C, Lu S, Kivlin R, Wallin B, Card E, Bagdasarian A, Tamakloe T, Chu WM, Guan KL, Wan Y. AMP-activated protein kinase contributes to UV- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in human skin keratinocytes. *J Biol Chem*. 2008; 283(43):28897-908.



**FIGURE 1. BBE protects against NE-induced decreased cell viability.** H9c2 cells were exposed to NE (100, 200 or 400 µM) for 24h. Cells were incubated with BBE (50 µg/ml) for 4h prior to NE exposure. Data expressed as percentage of viable cells compared to control. Values are expressed as mean ± standard deviation of 6 – 8 replicates. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  versus Control. <sup>b</sup>  $p < 0.05$  versus NE 100 µM. <sup>c</sup>  $p < 0.05$  versus NE 200 µM. <sup>d</sup>  $p < 0.05$  versus NE 400 µM.



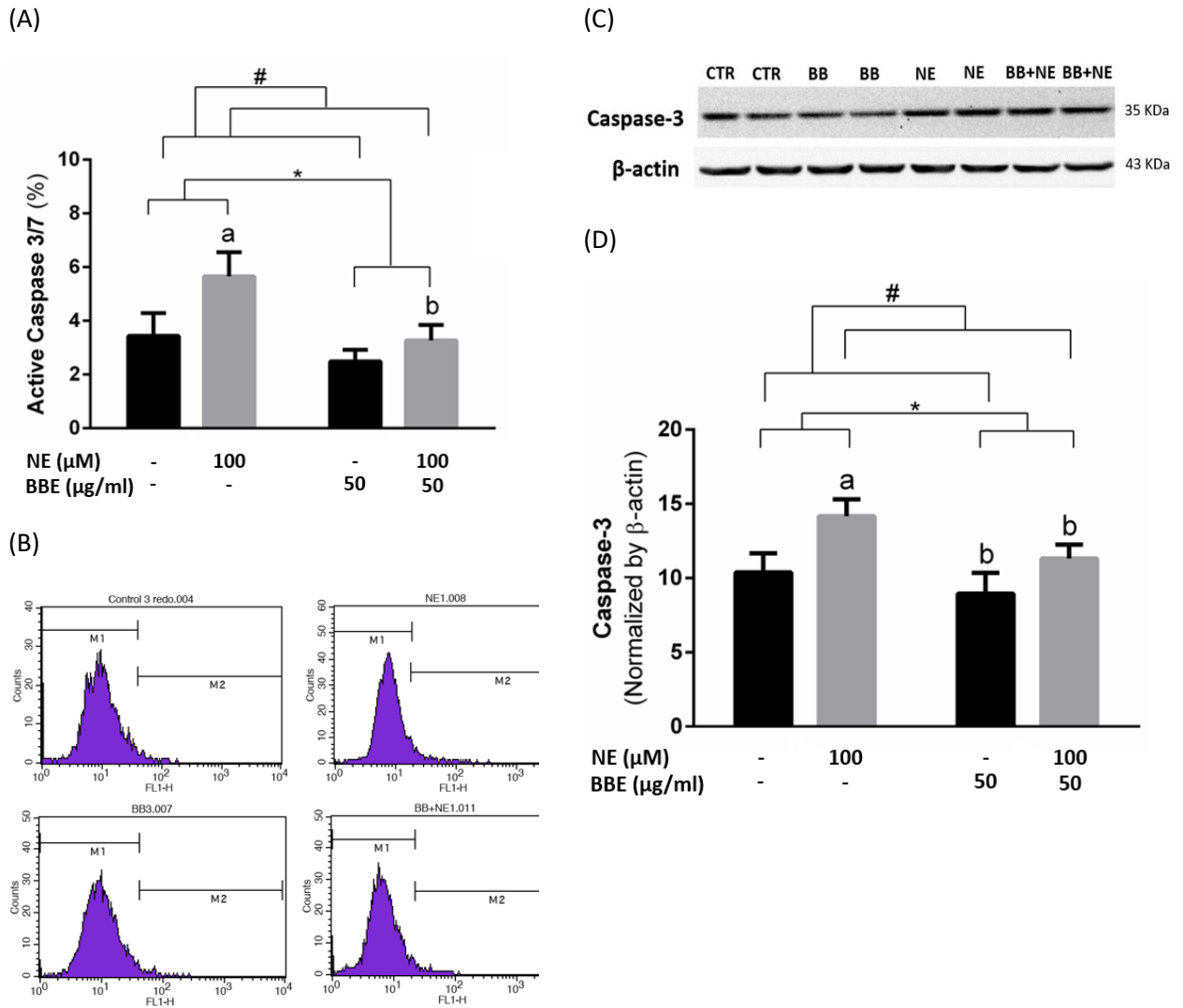
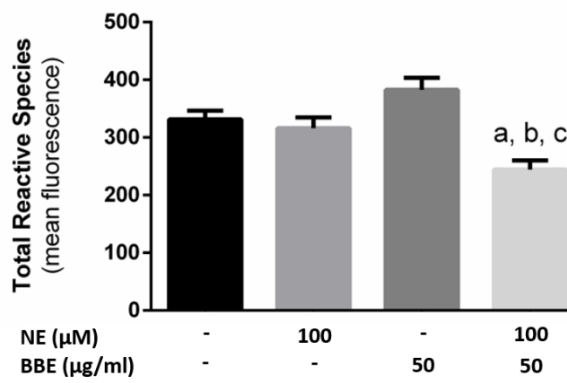
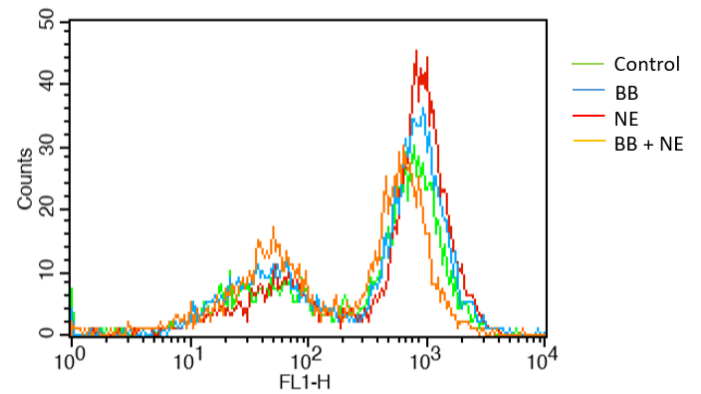


FIGURE 2. **BBE decreases NE-induced apoptosis.** H9c2 cells were preincubated with BBE (50 µg/ml) for 4h and subsequently exposed to 100 µM NE for 24h. Apoptosis was determined by measuring active caspase-3 and -7 positive cells using flow cytometry and immunoblot of caspase-3. A) Percentage of active caspases compared to control. B) Representative histogram of cell count versus FL1 fluorescence for each group is shown. C) Representative Western blot. D) Densitometric analysis of caspase-3. β-actin was used as a loading control. Values are expressed as mean ± standard deviation of 3 replicates (A) and 4 replicates (D). <sup>a</sup>  $p < 0.05$  versus untreated Control. <sup>b</sup>  $p < 0.05$  versus untreated NE 100 µM. \*  $p < 0.05$  untreated groups versus BBE 50 µg/ml groups. #  $p < 0.05$  non-exposed to NE groups versus NE 100 µM groups.

(A)

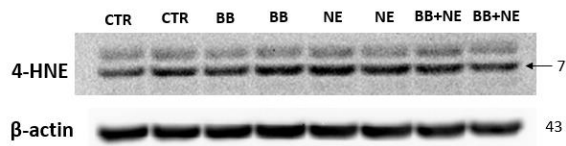


(B)



**FIGURE 3. BBE decreases total reactive oxygen species generation.** H9c2 cells were preincubated with BBE (50 ug/ml) for 4h and subsequently exposed to 100 μM NE for 24h. A) ROS levels were assessed using the CM-H<sub>2</sub>DCFDA assay and measured via flow cytometry. B) Representative histogram of cell count versus FL1 fluorescence is shown. Data is expressed as mean fluorescence arbitrary units (a.u.). Values are expressed as mean ± standard deviation of 3 replicates. <sup>a</sup>*p* < 0.05 versus Control. <sup>b</sup>*p* < 0.05 versus NE 100 μM. <sup>c</sup>*p* < 0.05 versus BBE 50 μg/ml.

(A)



(B)

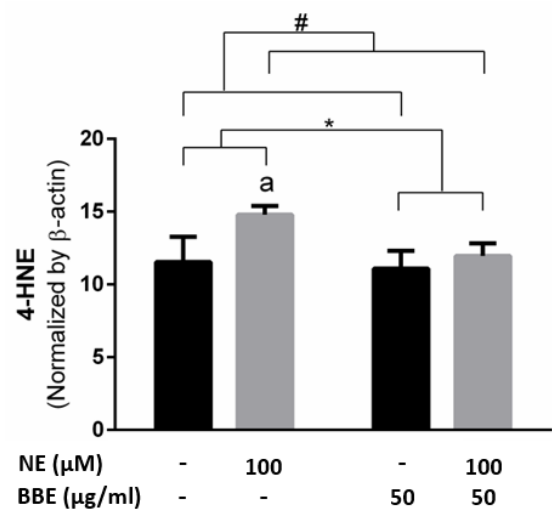


FIGURE 4. **BBE decreases NE-induced 4-HNE protein adduct formation.** H9c2 cells were preincubated with BBE 50  $\mu$ g/ml for 4h and subsequently exposed to 100  $\mu$ M NE for 24h. A) Representative Western blot B) Densitometric analysis of 4-hydroxynonenal protein adduct.  $\beta$ -actin was used as a loading control. Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of 4 replicates. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  versus Control. \*  $p < 0.05$  untreated groups versus BBE 50  $\mu$ g/ml groups. #  $p < 0.05$  non-exposed to NE groups versus NE 100  $\mu$ M groups.

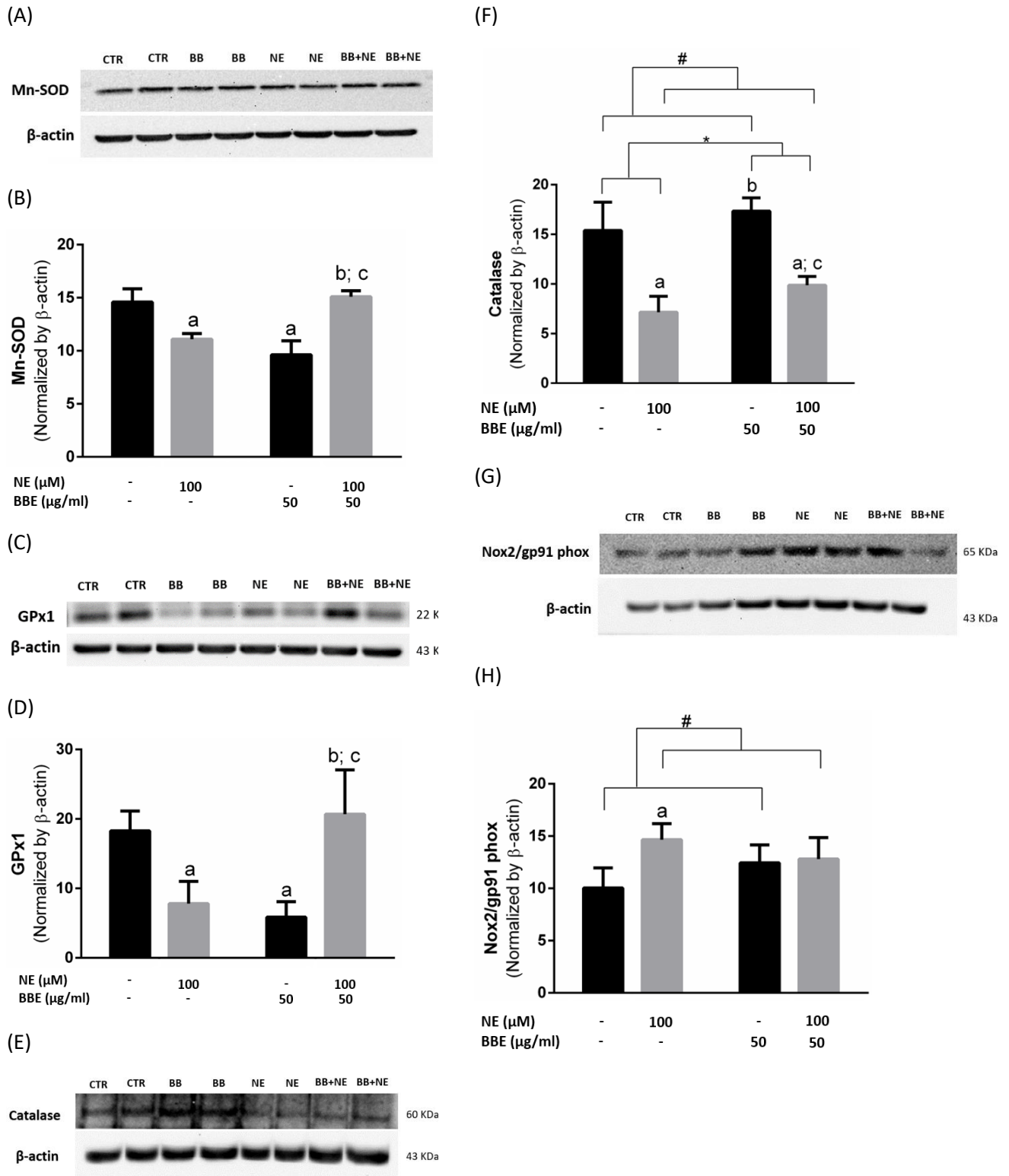
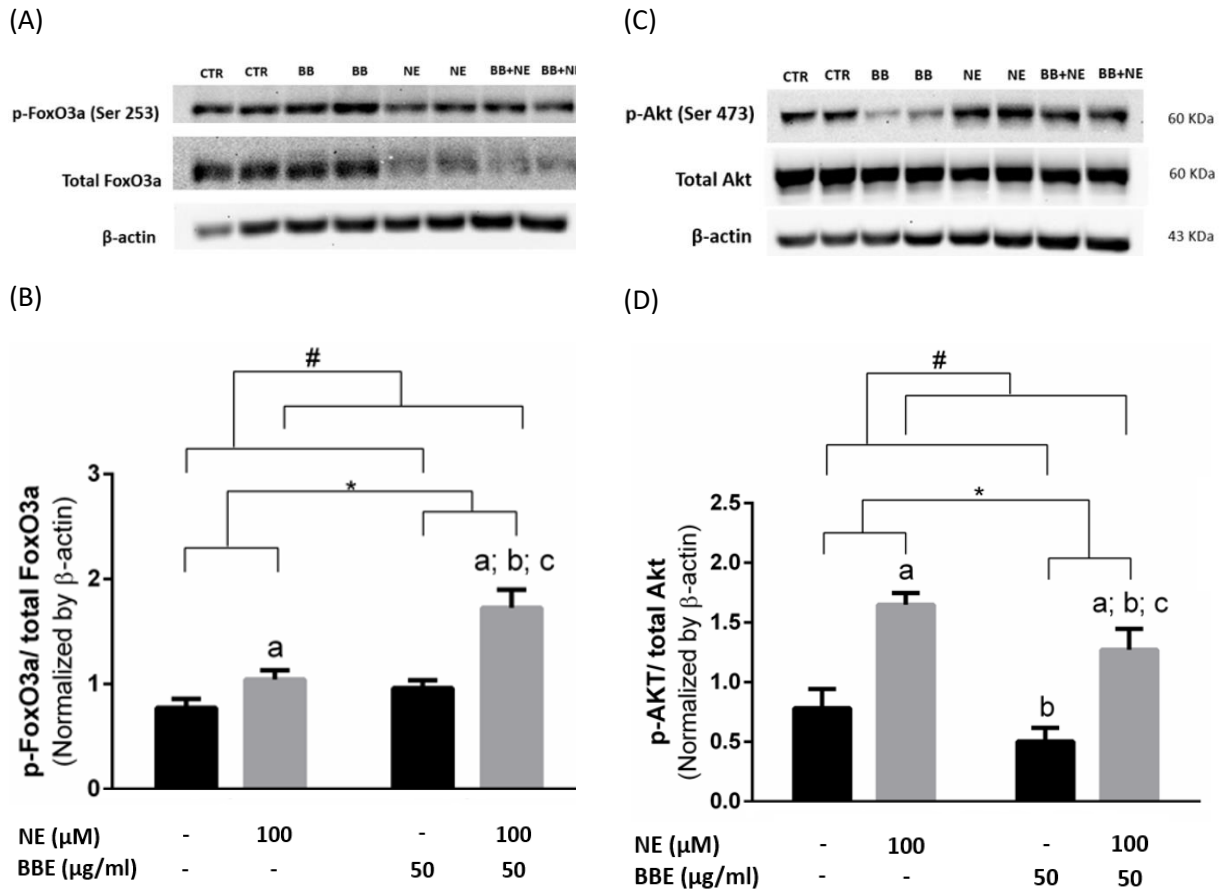
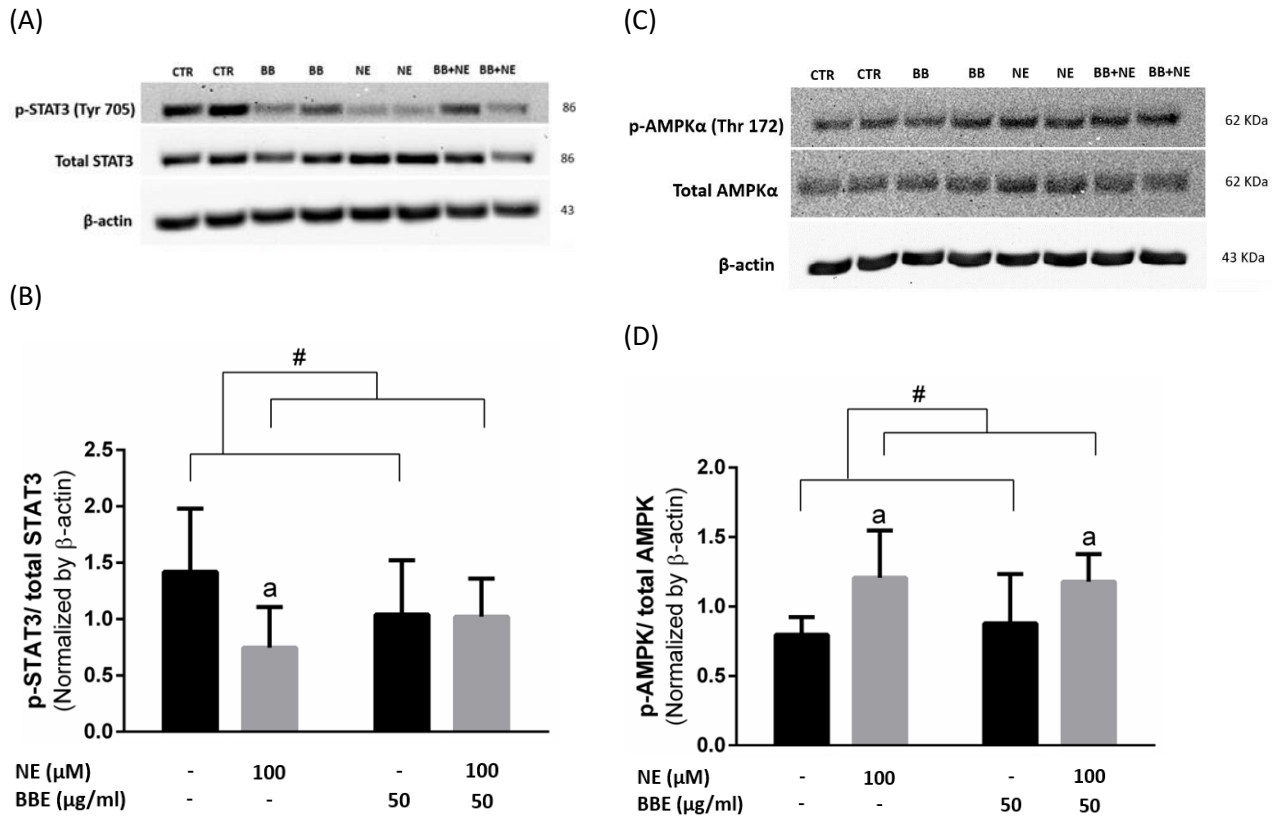


FIGURE 5. **BBE improves cellular redox state.** H9c2 cells were preincubated with BBE 50 μg/ml for 4h prior to 100 μM NE for 24h. A, C, E and G) Representative Western Blot and B, D, F and H) Densitometric analysis for Manganese superoxide dismutase (Mn-SOD), Glutathione peroxidase (GPx-1), Catalase and Nox2/gp91 phox. β-actin was used as a loading control. Values are expressed as mean ± standard deviation of 4 replicates. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  versus Control. <sup>b</sup>  $p < 0.05$  versus NE 100 μM. <sup>c</sup>  $p < 0.05$  versus BBE 50 μg/ml. \*  $p < 0.05$  untreated groups versus BBE 50 μg/ml groups. #  $p < 0.05$  non-exposed to NE groups versus NE 100 μM groups.

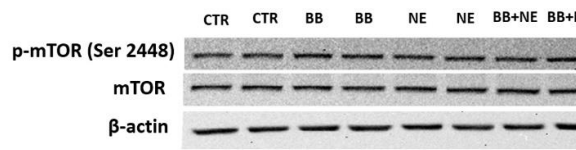


**FIGURE 6. BBE attenuates decrease Foxo3a activity induced by NE via Akt modulation.** H9c2 cells were preincubated with 50 µg/ml BBE for 4h and subsequently exposed to 100 µM NE for 24h. A and C) Representative Western Blot and B and D) Densitometric analysis of Foxo3a and Akt. Data is expressed as protein/β-actin arbitrary units (a.u). Values are expressed as mean ± standard deviation of 4 replicates. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  versus Control. <sup>b</sup>  $p < 0.05$  versus NE 100 µM. <sup>c</sup>  $p < 0.05$  versus BBE 50 µg/ml. \*  $p < 0.05$  untreated groups versus BBE 50 µg/ml groups. #  $p < 0.05$  non-exposed to NE groups versus NE 100 µM groups.

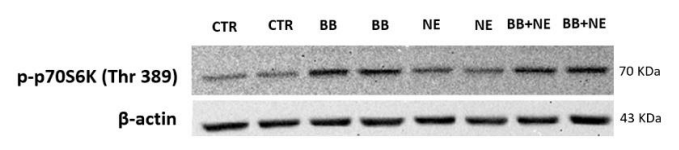


**FIGURE 7. BBE prevents the decrease in STAT3 expression but does not modify increased AMPKα expression induced by NE.** H9c2 cells were preincubated with BBE 50 μg/ml for 4h prior to 100 μM of NE exposure for 24 h. A and C) Representative Western Blot and B and D) Densitometric analysis for STAT3 and AMPKα. β-actin was used as a loading control. Values are expressed as mean ± standard deviation of 4 replicates. <sup>a</sup> *p* < 0.05 versus Control. # *p* < 0.05 non-exposed to NE groups versus NE 100 μM groups

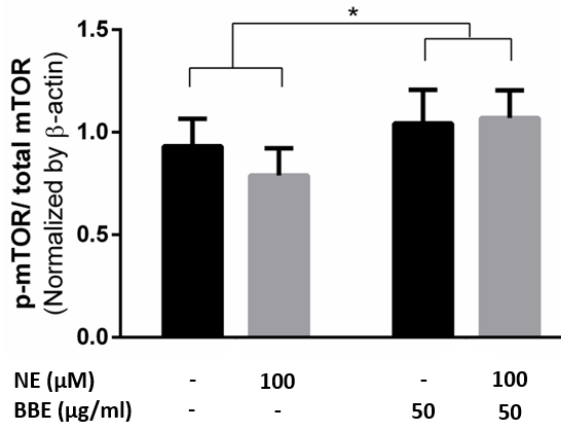
(A)



(C)



(B)



(D)

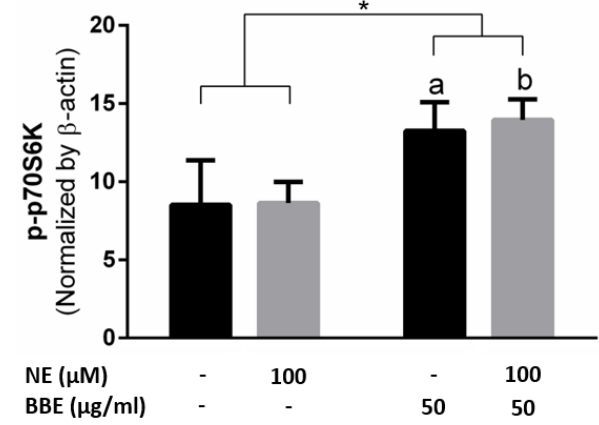


FIGURE 8. **BBE increases mTOR and p70S6K expression.** H9c2 were preincubated with BBE 50 μg/ml for 4h prior to exposure to 100 μM NE. A and C) representative Western Blot and B and D) Densitometric analysis for mTOR and p70S6K. β-actin was used as the loading control. Values are expressed as mean ± standard deviation of 4 replicates. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  versus Control. <sup>b</sup>  $p < 0.05$  versus NE 100 μM. \*  $p < 0.05$  untreated groups versus BBE 50 μg/ml groups.

## 5. DISCUSSÃO

Intervenções dietoterápicas têm sido bastante utilizadas na prevenção e no manejo de DCVs. Nesse contexto, alimentos ricos em antioxidantes surgem como alternativa, uma vez que demonstram modificações de fatores associados às DCVs, como melhora de perfil lipídico e diminuição de marcadores de inflamação, alterações associadas à melhora do estado redox. No entanto, no que diz respeito particularmente à HAP, faltam trabalhos que avaliem o potencial uso de intervenções dietoterápicas sobre o desenvolvimento da doença.

O presente trabalho analisou, pela primeira vez, o efeito do extrato de mirtilo sobre parâmetros funcionais, hemodinâmicos e de estresse oxidativo em animais com HAP induzida por monocrotalina. Além disso, avaliou o efeito do extrato de mirtilo sobre a sobrevivência/morte celular de cardiomiócitos em modelo *in vitro* de lesão induzida pela presença de noradrenalina, uma vez que na HAP há aumento da ativação simpática e da síntese e liberação de catecolaminas, processos que contribuem para as disfunções cardíacas observadas na doença.

O tratamento de animais com HAP induzida por MCT com o extrato de mirtilo, em todas as doses testadas, foi capaz de promover a melhora funcional de parâmetros relacionados ao fluxo sanguíneo pela artéria pulmonar e associados com a diástole e sístole do VD. Nesse sentido, foi encontrada uma redução na razão E/A em animais dos grupos MCT, enquanto o tratamento com o extrato foi capaz de atenuar essa modificação. A razão E/A é uma medida importante da função diastólica do VD, com a tendência de diminuição em pacientes com HAP, sendo, portanto, um índice relevante da patologia (CETIN et al., 2015). De fato, uma razão E/A < 1 indica dificuldades no relaxamento ventricular e está correlacionada com prejuízo diastólico (GALDERISI, 2005). A razão E/A diz respeito aos componentes de enchimento lento (E) e tardio (A) do VD durante a diástole observados no fluxo da valva tricúspide. Conforme há aumento da resistência da artéria pulmonar com o progresso da HAP, há perda da capacidade passiva de enchimento do VD durante a diástole, o qual passa a depender mais da sístole atrial para completar seu volume final (TÜRCK et al., 2018). A melhora da razão E/A verificada pelo tratamento com o extrato pode,



portanto, ser devido à menor resistência pulmonar, evitando comprometimento diastólico do VD.

O tratamento com extrato de mirtilo também protegeu o VD contra alterações sistólicas causadas pela HAP. Nesse sentido, a intervenção atenuou as reduções no TAPSE, na razão AT/ET e no débito cardíaco direito observadas nos animais MCT. O VD apresenta predominância de fibras que contraem longitudinalmente, sendo importante a avaliação da função sistólica a partir da análise do TAPSE, o qual se baseia no fato de que, quando a função contrátil do VD é normal, há um deslocamento razoável do anel tricúspide em direção ao ápice do VD durante a sístole (RUITER et al., 2013; KIMURA et al., 2015). Da mesma forma, a razão AT/ET (tempo de aceleração/tempo de ejeção) medida no fluxo da artéria pulmonar está associada ao desempenho sistólico do VD, uma vez que, disfunções sistólicas do VD causadas pela HAP refletem em, principalmente, maior tempo de ejeção devido ao esforço para vencer o aumento da pressão da artéria pulmonar (HOWARD et al., 2012).

Ambas as melhoras nos parâmetros de TAPSE e AT/ET promovidas pelo tratamento com o extrato de mirtilo irão repercutir em aumento do débito cardíaco do VD. Esse resultado é de fundamental relevância, já que o grande determinante do progresso da HAP e do desfecho final é a capacidade da função sistólica do VD em permanecer compatível com a pós-carga aumentada na patologia, evitando, inclusive, a disfunção diastólica advinda da fibrose miocárdica e enrijecimento de sarcômeros. A limitação do enchimento e ejeção do VD, com sua conseqüente hipertrofia, irão ocasionar prejuízos para o VE, com compressão dessa câmara e eventual diminuição da ejeção de sangue para a circulação sistêmica e agravamento da doença (NAEJIE e MANES, 2014). Nesse sentido, o extrato de mirtilo, particularmente na dose de 100 mg/kg/dia, reduziu os índices de hipertrofia do VD (peso VD/ peso corporal, peso VD/peso VE e peso VD/comprimento da tibia). Essa redução da hipertrofia como consequência do tratamento foi de encontro com a atenuação nos aumentos dos diâmetros finais durante a diástole e a sístole do VD observados nos animais MCT. A elevação dos diâmetros do VD já foi observada em outros trabalhos com o mesmo modelo, indicando dilatação da câmara e precedendo a insuficiência cardíaca direita (HARDZIYENKA et al., 2006).

As melhoras funcionais observadas como resultado do tratamento com o extrato de mirtilo podem ser reflexo de efeitos diretos dos compostos (em especial os fenólicos) presentes no extrato sobre o tecido cardíaco direito ou ainda surgirem como consequência de melhoras hemodinâmicas da unidade cardiopulmonar direita. Por esse último ângulo, os animais com HAP induzida apresentaram acentuado aumento na pressão sistólica do VD (PSVD), a qual se mostrou reduzida nos animais tratados. Esse aumento é comum aos 21 dias do progresso da doença em modelo de MCT, sendo reportado em outros trabalhos (MOSELE et al., 2012). Além disso, clinicamente, a elevação da pressão sistólica do VD na HAP ocorre por conta dos aumentos da resistência da vasculatura pulmonar e elevação da pressão média na artéria pulmonar (PMAP) (YEN-CHUN et al., 2014). De fato, o extrato de mirtilo reduziu a PMAP, o que pode ter sido devido à menor resistência vascular pulmonar e pode ter repercutido na diminuição da PSVD.

Também se verificou um aumento das derivadas de contratilidade e relaxamento ( $dP/dt$  positiva e negativa, respectivamente) das ondas de pressão sistólica do VD nos animais MCT. Outros trabalhos demonstram essa elevação de ambas derivadas após 21 ou 28 dias de exposição de ratos à monocrotalina (YUN et al., 2001; CUI et al., 2009). Tratamentos que reverteram o aumento da PSVD e amenizaram a hipertrofia do VD na HAP, em paralelo também levaram as  $dP/dt$  a níveis normais (FALCÃO-PIRES et al., 2009). Assim, o aumento da contratilidade e do relaxamento parece ser um mecanismo compensatório pelo qual o VD busca retardar sua progressiva perda de função com o avanço da doença no modelo da MCT. Nesse sentido, o extrato do mirtilo na dose de 100 mg/kg/dia, considerando seus efeitos sobre os outros parâmetros já relatados, atenuou a derivada de contratilidade verificada na PSVD.

Uma das explicações possíveis para as melhoras hemodinâmicas observadas, se encontra no fato de que o extrato, ao menos na dose de 100 mg/kg/dia, foi capaz de alterar a expressão dos receptores de endotelina, uma das principais moléculas vasoconstritoras alteradas na HAP (PEPKE-ZABA e MORELL, 2005). No geral, a endotelina exerce suas ações vasculares se ligando a seu receptor tipo A ( $ET_A$ R - promovendo vasoconstrição) ou tipo B ( $ET_B$ R - promovendo vasodilatação) (SCHNEIDER et al., 2010). Em modelos de HAP, já

se verificou diminuição da expressão de  $ET_{B}R$  na vasculatura pulmonar (ZIMMER et al., 2017), bem como se observou que o bloqueio específico de  $ET_{A}R$  atenuou prejuízos provocados pela HAP ao melhorar a resposta à vasodilatação da artéria pulmonar (TONEY et al., 2014). Em nosso trabalho, verificamos diminuição da razão  $ET_{A}R/ET_{B}R$ , a qual se encontrou aumentada nos pulmões dos animais MCT. Esse resultado, indicativo de redução da vasoconstrição pulmonar, mesmo se tomado de forma independente de outros fatores envolvidos na HAP, já poderia interpretar os resultados funcionais encontrados quando do tratamento com o extrato de mirtilo. Porém, no presente trabalho, decidimos ainda por avaliar outros mecanismos pelos quais o tratamento poderia exercer seus efeitos, com particular enfoque no estado redox do tecido pulmonar e do tecido cardíaco direito.

Ao promover a inativação do NO, a peroxidação lipídica, danos ao DNA e modificação de proteínas, o estresse oxidativo desempenha um papel fundamental na disfunção endotelial, a qual leva a danos na vasculatura. Além disso, as EROs ativam muitos mecanismos redox sensíveis, como vias de sinalização intracelulares relacionadas ao crescimento e proliferação da camada muscular lisa e células endoteliais, contribuindo para o remodelamento vascular, uma característica da HAP (INTENGAN e SCHIFFRIN, 2001). Assim, ao analisar o conteúdo de EROs totais no tecido pulmonar, observamos um aumento nos animais MCT. O extrato de mirtilo, em todas as doses testadas, ocasionou diminuição das EROs totais, dado que vai de encontro com outros estudos em que o extrato de mirtilo foi utilizado (SONG et al., 2016; SUN Y, 2019).

Partindo do resultado já discutido de diminuição da razão  $ET_{A}R/ET_{B}R$  no tecido pulmonar devido ao tratamento com extrato de mirtilo, o bloqueio do  $ET_{A}R$  já demonstrou levar à diminuição dos níveis vasculares de  $O_2^{\cdot-}$  (CALLERA et al., 2003), bem como o aumento de EROs mediado por endotelina foi associado ao aumento da atividade das enzimas NADPH oxidases (LUND et al., 2005). Nesse contexto, é consenso que as NADPH oxidases estão reguladas positivamente, tanto em sua atividade quanto em sua expressão, na vasculatura de indivíduos hipertensos, sendo associadas ao desenvolvimento de doenças macro e microvasculares (LACERDA et al., 2017). Em nosso estudo, verificamos o aumento da atividade de NADPH oxidases no tecido pulmonar dos animais com

HAP induzida, o qual não ocorreu frente ao tratamento com o extrato. Outra fonte de produção de  $O_2^{\cdot-}$  é a enzima xantina oxidase, a qual já foi reportada como tendo sua atividade aumentada em pacientes com HAP idiopáticos em comparação com indivíduos saudáveis (SPIEKERMANN et al., 2009). De fato, nos animais MCT verificamos aumento da expressão dessa enzima pró-oxidante, sendo que a intervenção com mirtilo diminuiu sua expressão. Assim, esses resultados que incluem a regulação negativa de oxidases podem estar relacionados à redução das EROs totais, além de serem consistentes com os achados de outros autores que usaram diferentes extratos (RAMESH e BEGUM, 2008; TAN et al., 2014).

Em relação aos marcadores de dano oxidativo no tecido pulmonar, O conteúdo de carbonilas, indicativo de oxidação proteica, permaneceu inalterado nos animais MCT e tratados com extrato em relação aos controles. Esse achado difere do observado por Wong et al. (2013), que descreveram maiores níveis de carbonilas no plasma em indivíduos com HAP idiopática comparados com indivíduos saudáveis, o que pode ser explicado por se tratar de tecidos diferentes ou ainda esse resultado não se reproduzir no modelo experimental utilizado. Estudos demonstram a capacidade do extrato de mirtilo em inibir a oxidação lipídica causada por distintos agentes oxidantes em diferentes tipos celulares (MORITA et al., 2017; SPOHR et al., 2019). Nesse sentido, verificamos que o tratamento com o extrato de mirtilo reduziu a lipoperoxidação no tecido pulmonar, um desfecho desejável, considerando que lipídios oxidados participam de vários processos fisiopatológicos da HAP, como proliferação de células musculares lisas, apoptose de células endoteliais e inflamação (SHARMA et al., 2016).

Em termos das defesas antioxidantes, o tratamento com extrato de mirtilo aumentou a atividade da enzima SOD nos pulmões dos animais, a qual estava diminuída nos grupos MCT. Esse resultado vai de encontro com o trabalho de Tan et al. (2014), em que o uso de um extrato de mirtilo enriquecido com antocianinas promoveu maior atividade de SOD e atenuou lesões pulmonares induzidas por ciclofosfamida em ratos. Curiosamente, outro estudo avaliando toxicidade pulmonar evidenciou que o tratamento com o extrato de outra *berry*, *Carissa opaca*, restaurou a atividade de SOD nesse tecido (SAHREEN et al., 2014). O excesso de  $O_2^{\cdot-}$  pode antagonizar diretamente as ações do óxido nítrico

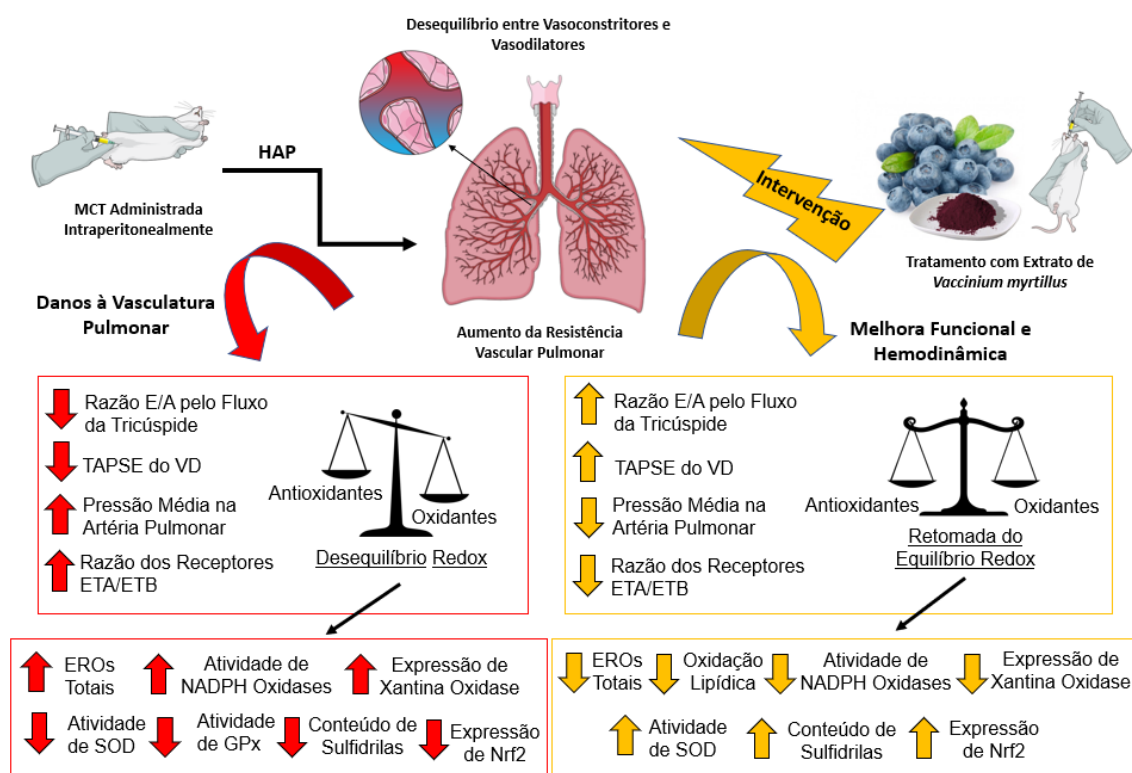
(NO) por uma interação química direta. O NO derivado do endotélio controla o relaxamento da musculatura lisa vascular, inibe a agregação plaquetária e atenua a adesão dos neutrófilos ao endotélio (WANG et al., 2018). Nesse sentido, ao promover a remoção do  $O_2^{\cdot-}$  celular, a enzima SOD se opõe à inativação do NO vascular, tendo papel crucial para a manutenção do tônus dos vasos sanguíneos. Dessa forma, o tratamento com o extrato de mirtilo não só diminuiu a resposta vasoconstritora sobre a vasculatura pulmonar ao reduzir a razão  $ET_{AR}/ET_{BR}$ , mas também pode ter contribuído para o aumento da resposta vasodilatadora, ao aumentar a biodisponibilidade do NO.

Outras defesas antioxidantes enzimáticas, como catalase e glutathione peroxidase (GPx), também tem se apresentado diminuídas no tecido pulmonar em modelos de HAP e em paciente com HAP idiopática, reduções associadas a alterações na disponibilidade do NO e na PMAP (ADESINA et al., 2013; MASRI et al., 2008). Ambas enzimas apresentam a capacidade de manter os níveis celulares de  $H_2O_2$  dentro de limite fisiológicos. Porém, particularmente, a GPx também atua em outros peróxidos que não o  $H_2O_2$ , como os hidroperóxidos de ácidos graxos, promovendo sua redução, podendo a modulação dessa enzima explicar a redução da lipoperoxidação observada pela intervenção com mirtilo em nosso trabalho. De fato, observamos redução da atividade de GPx nos pulmões dos animais MCT. Entretanto, o tratamento com extrato de mirtilo não modificou esse parâmetro. Na condição do tratamento, porém, como verificamos aumento da atividade de SOD e diminuição da atividade e expressão de oxidases, uma elevação da retirada de  $H_2O_2$  ou hidroperóxidos lipídicos do sistema pode não ter sido necessária, tendo em vista sua menor formação.

Além disso, aferimos retomada dos níveis de sulfidrilas nos grupos tratados com o extrato, os quais estavam diminuídos nos animais com HAP. Evidências relatam que o NO regula a função celular interagindo com tióis críticos, levando à formação de proteínas e de pequenos grupamentos nitrosotióis moleculares (ZEN-GUO et al., 1995). A fonte mais rica de tióis reduzidos é o grupo das proteínas sulfidrilas, e a ativação da enzima guanilato ciclase por NO requer a presença de sulfidrilas reduzidas (MATTHEW et al., 2002). Portanto, o aumento de sulfidrilas no tecido pulmonar ocasionado pelo

extrato de mirtilo também é um indício do possível benefício do tratamento sobre o metabolismo do NO.

A resposta antioxidante pode ser regulada pela ativação do fator transcricional Nrf2, que desempenha um papel central na resposta redox quando translocado para o núcleo celular, ativando a transcrição de genes de várias enzimas com propriedades antioxidantes (BARBOSA et al., 2016). Conforme descrito por Chen et al. (2017), o uso de polifenóis é capaz de estimular a ativação do Nrf2 no tecido pulmonar em modelo de HAP induzida por MCT, culminando em atenuação do remodelamento vascular pulmonar através da melhora do estado redox. Nosso trabalho vai de encontro com esses achados, uma vez que observamos menor expressão do Nrf2 nos pulmões dos animais MCT, ao passo que o tratamento com o extrato de mirtilo retomou a expressão desse fator para os níveis dos animais saudáveis. Um resumo das ações do extrato de mirtilo sobre o tecido pulmonar é mostrado na Figura 4.



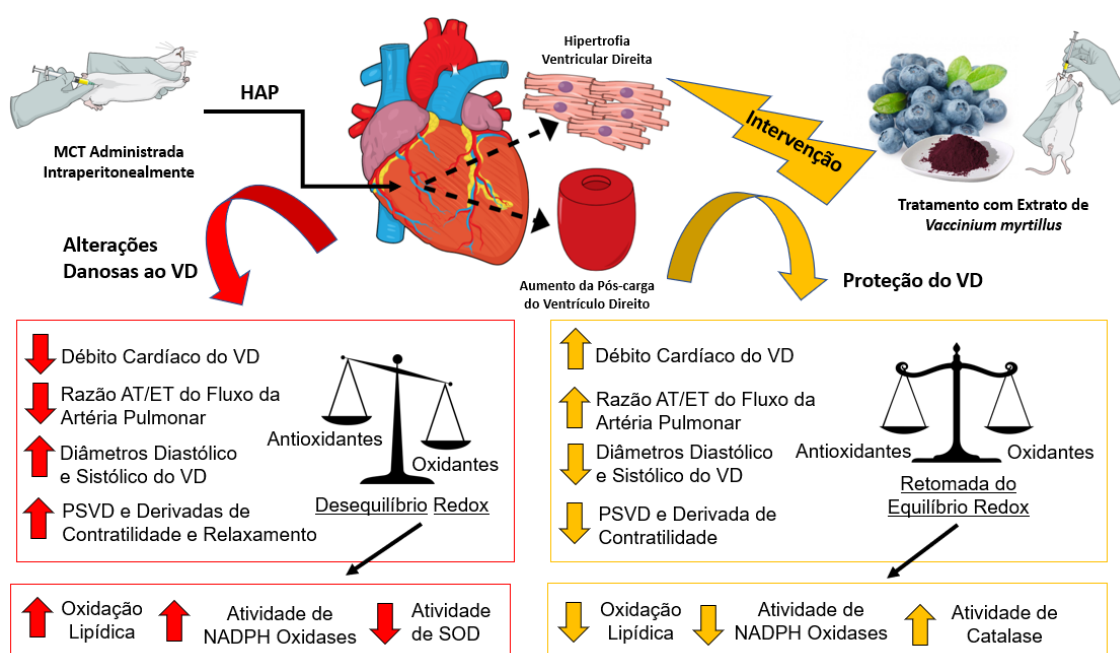
**Figura 4:** Efeitos do extrato de mirtilo sobre o tecido pulmonar em modelo de HAP induzida por monocrotalina

Ao analisarmos o equilíbrio redox no VD, também verificamos diminuição de danos oxidativos e melhora das defesas antioxidantes. Assim como no tecido

pulmonar, o tratamento com o extrato de mirtilo causou redução da lipoperoxidação, aumentada nos animais MCT. O aumento da oxidação de lipídios tem sido associado a lesões ao sarcolema e aos elementos do citoesqueleto das células cardíacas, com consequente morte celular (VANWINKLE et al., 1994). A diminuição dos níveis de oxidação lipídica, pode, portanto, ter contribuído para a homeostase do cálcio e consequente sobrevivência dos cardiomiócitos do VD. Além disso, o extrato de mirtilo também reduziu a atividade das enzimas NADPH oxidases no VD, elevada nos animais com HAP induzida. A ativação das isoformas Nox4 e Nox2 já foi demonstrada no VE frente ao aumento de pós-carga, contribuindo para a progressão da disfunção ventricular esquerda e insuficiência da câmara via processos que levam à morte de cardiomiócitos (FRAZZIANO et al., 2014). He et al. (2017) reportaram aumento da expressão de Nox4 no VD de animais com HAP induzida por MCT, resultado que foi correlacionado com maior expressão do fator TGF-1 $\beta$  e desenvolvimento de fibrose do VD. Assim, a diminuição da atividade das NADPH oxidases observadas pelo tratamento com o extrato de mirtilo pode ter contribuído para as melhoras funcionais do VD previamente discutidas. Diferentemente do tecido pulmonar, não observamos alterações no imunoconteúdo da enzima xantina oxidase entre os grupos de nosso estudo. Porém, conforme já abordado, alterações na xantina oxidase podem ocorrer mais acentuadamente na vasculatura pulmonar, na qual níveis exacerbados de O<sub>2</sub><sup>-</sup> podem prejudicar a formação de NO e contribuir para o aumento da resistência vascular pulmonar, afetando indiretamente o VD.

Em relação às defesas antioxidantes do VD, a suplementação com o extrato de mirtilo ocasionou elevação na atividade da enzima catalase em comparação com os animais controle e animais MCT não tratados. A regulação positiva da enzima catalase foi reportada no VE de animais que receberam extrato de folhas de mirtilo, resultando em menor oxidação lipídica e protegendo o coração contra alterações histopatológicas em modelo de hipertrofia cardíaca induzida por isoprenalina (ELADWY et al., 2018). Em nosso estudo, o tratamento com o extrato de mirtilo não recuperou a atividade diminuída da enzima SOD, verificada nos animais MCT, e não alterou a atividade ou expressão da enzima GPx no VD, dados que diferem de outros trabalhos que demonstram a atuação

do extrato sobre essas defesas antioxidantes (LOUIS et al., 2014; LIU et al., 2015). Esse resultado pode ser explicado pelo fato desses estudos avaliarem a ação do extrato em cardiomiócitos isolados e em modelo de dano cardíaco não específico do VD, respectivamente. Ainda, ao regular negativamente a atividade de NADPH oxidases e estimular a atividade de catalase, infere-se uma possível diminuição nos níveis de  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$ , originando um ambiente celular menos oxidante, o que resultaria em menor estímulo e necessidade de ativação de outros mecanismos de manutenção do estado redox. Um resumo das contribuições do extrato de mirtilo sobre o VD é mostrado na Figura 5.



**Figura 5:** Efeitos do extrato de mirtilo sobre o VD em modelo de HAP induzida por monocrotalina

Um dos mecanismos envolvidos na disfunção ventricular direita na HAP é o desequilíbrio do sistema nervoso autônomo, causado por hiperatividade do sistema nervoso simpático (HEMNES e BRITAIN, 2018). Esse achado é observado tanto em modelos animais de HAP (GONÇALVES et al., 2010) quanto em pacientes acometidos pela doença (WENSEL et al., 2009). Em modelo de HAP induzida por MCT, foi relatado o aumento da atividade simpática, resultado correlacionado com o remodelamento cardíaco mal adaptativo e hipertrofia do VD, com progressão para insuficiência cardíaca direita (ZIMMER et al., 2019). Tal fato parece ser consequência dos efeitos deletérios do excesso de noradrenalina e sua prolongada exposição sobre cardiomiócitos, a qual ocasiona



aumento nos níveis de endotelina, citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, bem como conduz à sobrecarga do cálcio intracelular, elevação da permeabilidade do sarcolema e morte celular (COLUCCI, 1998). Dentre os processos danosos desencadeado pela noradrenalina está a perda do equilíbrio redox, com elevada produção de agentes oxidantes e atenuação dos mecanismos antioxidantes, levando ao estabelecimento do quadro de estresse oxidativo celular e apoptose de cardiomiócitos (LOUIS et al., 2014, LIMA-SEOLIN et al., 2019).

Assim, como observamos destacadas perdas funcionais cardiopulmonares nos animais com HAP induzida, em especial devido à quebra da homeostase redox, e considerando os dados da literatura, é racional inferirmos que essas alterações, ao menos em parte, estejam associadas com efeitos deletérios da noradrenalina sobre o VD. Portanto, visando a investigar o papel protetor do extrato de mirtilo em uma situação de dano celular via estresse oxidativo induzido por noradrenalina, em especial analisando possíveis vias de sinalização envolvidas com o equilíbrio redox e com a morte/sobrevivência celular, desenvolvemos um modelo *in vitro* mimetizando a condição em que células cardíacas do VD se encontram na HAP no que se refere à exposição acentuada a essa catecolamina.

Em nosso modelo *in vitro*, o extrato de mirtilo preveniu a morte celular de cardiomiócitos, diminuindo a ativação de caspases 3/7, bem como reduzindo a expressão de capase-3, parâmetros elevados na condição de exposição à noradrenalina. Resultados semelhantes já foram reportados, em que o extrato de mirtilo reduziu a marcação para apoptose de células H9c2 verificada por coloração de Hoechst e ativação de caspases 3/7 (LOUIS et al., 2014; SUN et al., 2019). A presença de noradrenalina no meio de cultivo causou aumento de EROs totais, em parte como consequência de maior expressão da Nox2, elevando os níveis celulares de  $O_2^{\cdot-}$ . Esse dado vai de encontro com o trabalho de Gustafson et al. (2012), em que é demonstrada a capacidade do extrato de mirtilo em atenuar a formação de EROs dependente de NADPH oxidases em células neuronais SH-SY5Y. Além disso, polifenóis derivados do mirtilo, quando inseridos na dieta de indivíduos, diminuíram a atividade de NAPDH oxidases em neutrófilos circulantes (RODRIGUEZ-MATEOS et al, 2013). Em nosso estudo,

observamos aumento da expressão do marcador de oxidação lipídica 4-HNE em cardiomiócitos expostos à noradrenalina, com atenuação causada pelo extrato de mirtilo. Esse dado é grande relevância, tendo em vista que estudos verificaram que o 4-HNE forma adutos com proteínas, levando a danos celulares e disfunção cardíaca, contribuindo para a contratilidade cardíaca prejudicada e promovendo a apoptose dos cardiomiócitos e disfunção cardíaca (FOLDEN et al., 2003; MALI e PALANIYANDI, 2014).

O cultivo das células cardíacas na presença de noradrenalina também gerou prejuízos ao sistema antioxidante enzimático, com reduções na expressão proteica das enzimas Mn-SOD, GPx e catalase, de forma similar ao reportado por Louis et al., 2014. Verificamos que o extrato de mirtilo anulou ou atenuou essas quedas nas expressões enzimáticas. Esse resultado vai de encontro com o relatado por outros estudos utilizando o extrato de mirtilo como intervenção em modelos de dano cardíaco, os quais associaram o estímulo às defesas antioxidantes e consequente retomada do equilíbrio redox como sendo os componentes chave na conferência de proteção ao miocárdio gerada pelo extrato (LOUIS et al., 2014; LIU et al., 2015). É interessante observar que os resultados em relação ao equilíbrio redox apresentados quando da exposição de noradrenalina aos cardiomiócitos *in vitro*, refletem em grande parte os dados observados para o VD na HAP em nossos estudos *in vivo*, os quais apresentaram aumento na produção de espécies oxidantes e comprometimento dos mecanismos antioxidantes. O extrato de mirtilo, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, promoveu a retomada da homeostase redox. Nesse sentido, analisamos ainda no nosso modelo *in vitro* possíveis modificações em vias de sinalização envolvidas com o estado redox e com a morte/sobrevivência celular que poderiam estar envolvidas no acometimento do VD na HAP.

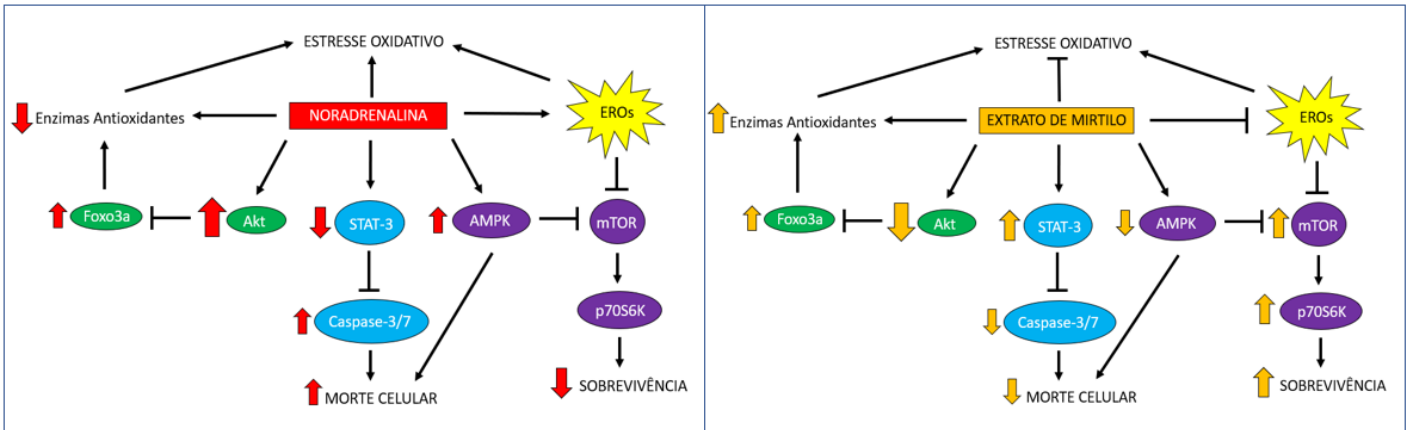
A proteína FoxO3a foi descrita como um fator de transcrição fundamental por ser responsável por mediar a resistência ao estresse oxidativo em várias condições (CHIRIBAU et al., 2008; MORRIS et al., 2015). Sengupta et al. (2001) relataram que FoxO3a desempenha um papel crucial na promoção da sobrevivência de cardiomiócitos em resposta a estímulos de estresse oxidativo. A perda combinada dos fatores FoxO1 e FoxO3 em cardiomiócitos levou ao aumento do estresse oxidativo e redução das reservas antioxidantes em ratos,

resultando em remodelamento ventricular adverso e disfunção cardíaca após lesão isquêmica. Em nosso trabalho, mostramos que a noradrenalina aumentou a atividade do FoxO3a e, curiosamente, o extrato de mirtilo acentuou esse aumento. A regulação positiva de FoxO3a pode ocorrer como uma tentativa de proteger as células cardíacas do dano oxidativo induzido por noradrenalina, o que foi mais proeminente na presença do extrato. A fosforilação de FoxO induzida pela proteína Akt resulta na inativação de FoxO e sua exclusão do núcleo, resultando na atenuação da expressão de genes dependentes de FoxO, como aqueles que codificam as enzimas antioxidantes que investigamos no nosso trabalho (KLOTZ et al., 2015). De fato, a noradrenalina aumentou a expressão de Akt, atenuada pelo extrato de mirtilo, o que está de acordo com os resultados observados para o Foxo3a.

Alguns trabalhos relataram o papel da proteína STAT3 na regulação da localização subcelular de FoxO, bem como na promoção da transcrição de FoxO3a (BRAULT et al., 2010; OH et al., 2012; SHI et al., 2018). Além disso, STAT3 inibe a ativação de caspase-3 e regula a transcrição de genes promotores da resposta à sobrevivência, como *Bcl-2* e *Bcl-XL* (SID et al., 2013). Em nosso trabalho, a exposição à noradrenalina diminuiu a razão da expressão de p-STAT3 (Tyr705)/STAT3 total, um efeito que foi anulado pelo extrato de mirtilo. Ademais, o aumento na expressão de STAT3 pode ser responsável pela proteção contra o estresse oxidativo via modulação de Ref-1 e diminuição da produção de EROs mitocondriais, contribuindo para a melhora do estado redox observado pelo extrato (HAGA et al., 2003; POLI e CAMPOREALE, 2015). Além disso, foi relatado que STAT3 pode ser fosforilada e ativada pela proteína AMPK $\alpha$ , levando à supressão da produção de citocinas inflamatórias em macrófagos (ZHU et al., 2015). Curiosamente, em nosso estudo a expressão de AMPK $\alpha$  foi maior no grupo exposto à noradrenalina, enquanto o extrato de mirtilo não a modificou. Assim, a diminuição da fosforilação de STAT3 induzida por noradrenalina parece não ser devido ao comprometimento da AMPK $\alpha$ , mas por diferentes vias de sinalização. No entanto, modificações no conteúdo de AMPK $\alpha$  podem influenciar outros mecanismos celulares, como a sinalização de sobrevivência/morte via celular mTOR/p70S6K (SID et al., 2013).

A ativação do mTOR / p70S6K ocorre em resposta a estímulos provocados por fatores de crescimento ou agonistas adrenérgicos, como a noradrenalina, e leva à síntese de proteínas e inibição da degradação de proteínas e organelas (DORN e FORCE, 2005). No entanto, o papel de mTOR/p70S6K no remodelamento cardíaco ainda não está completamente esclarecido. Estudos demonstraram que essa via está ligada à hipertrofia cardíaca e que o tratamento com rapamicina atenuou o desenvolvimento de hipertrofia induzida por sobrecarga de pressão (MCMULLEN et al., 2004). No entanto, a inativação de mTOR em camundongos levou a fração de ejeção e frequência cardíaca reduzidas (SHEN et al., 2008), bem como a ablação de mTOR no miocárdio de camundongos adultos resultou em cardiomiopatia dilatada, caracterizada por apoptose, autofagia e estrutura mitocondrial alterada (ZHANG et al., 2010). Em condições de estresse oxidativo, mTOR parece ser inibida como consequência da inibição de Akt ou ativação de AMPK (CHEN et al., 2010), sendo essa última alteração verificada nas células tratadas com noradrenalina em nosso trabalho. O extrato de mirtilo não apenas diminuiu a expressão de Akt, mas também diminuiu a expressão de AMPK, o que poderia explicar a ativação de mTOR/p70S6K observada. Vale ressaltar que o aumento da expressão de mTOR/p70S6K também pode ser devido a vias paralelas estimuladas pelo extrato, como relatado anteriormente (WILLIAMS et al., 2008). Dados da literatura mostram que a regulação negativa de mTOR/p70S6K tem sido associada à morte celular (CAO et al., 2008; CHEN et al., 2010), enquanto o aumento da atividade de catalase ou a presença do antioxidante N-acetilcisteína podem estimular mTOR/p70S6K e contribuir para a sobrevivência celular (GUTIÉRREZ-UZQUIZA et al., 2012). Consequentemente, o potencial do extrato de mirtilo em impedir a diminuição de mTOR/p70S6K parece ser outra via que contribuiu para o aumento da viabilidade celular dos cardiomiócitos quando esses foram expostos à noradrenalina.

Na Figura 6 pode-se observar as principais alterações causadas aos cardiomiócitos pela exposição à noradrenalina, bem como os efeitos do extrato de mirtilo sobre essas modificações abordados nesse trabalho.



**Figura 6:** Resumo dos principais efeitos do extrato de mirtilo sobre o estado redox e vias de sinalização de morte/sobrevivência de cardiomiócitos cultivados na presença de noradrenalina.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De forma geral, o conjunto de resultados da presente tese destaca os efeitos protetores do extrato de mirtilo na condição patológica de HAP. Verificamos que o extrato atua levando à atenuação dos comprometimentos funcionais e hemodinâmicos pulmonares e do VD através da modulação dos mecanismos redox, minimizando o quadro de estresse oxidativo. Particularmente, através de nosso modelo *in vitro* reproduzindo a condição de alta exposição à noradrenalina a qual estaria submetido o VD na HAP, sugerimos diversas vias de sinalização envolvidas no equilíbrio redox e na morte/sobrevivência celular que poderiam estar envolvidas nas ações cardioprotetoras do extrato de mirtilo sobre o VD. Diante dos dados apresentados, o extrato de mirtilo poderia ser usado como uma intervenção dietoterápica e tratamento complementar à terapia farmacológica disponível na HAP, a fim de minimizar os efeitos deletérios do desequilíbrio oxidativo sobre a homeostase e função cardíaca.

## 7. PERSPECTIVAS

Como perspectivas dessa tese, podemos citar:

- Analisar o equilíbrio simpato-vagal em animais com HAP e os efeitos do extrato de mirtilo sobre a modulação do sistema nervoso autônomo.
- Analisar a expressão do receptor  $\beta$ 1-adrenérgico no VD de animais com HAP e os efeitos do extrato de mirtilo sobre essa expressão.
- Analisar a expressão de proteínas relacionadas com a homeostase do cálcio no VD de animais com HAP e os efeitos do extrato de mirtilo sobre essa expressão.
- Analisar a reatividade vascular à acetilcolina e fenilefrina da artéria pulmonar isolada de animais com HAP e os efeitos do extrato de mirtilo sobre essa resposta.

## 8. REFERÊNCIAS

- ADESINA S.E. *et al.* Mitochondrial catalase expression protects against hypoxia-induced pulmonary hypertension. **FASEB Journal**, v. 27, 2013.
- AGGARWAL S. *et al.* Reactive oxygen species in pulmonary vascular remodeling. **Compr Physiol**, v. 3, n. 3, p. 1011-1034, 2013.
- AHMET I. *et al.* Blueberry-enriched diet protects rat heart from ischemic damage. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e5954, 2009.
- AHMET I. *et al.* Survival and cardioprotective benefits of long-term blueberry enriched diet in dilated cardiomyopathy following myocardial infarction in rats. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7975, 2009.
- AKSENOV M.Y., MARKESBERY W.R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**, v. 302, p. 141-5, 2001.
- ALKHALF M.I., KHALIFA F.K. Blueberry extract attenuates  $\gamma$ -radiation-induced hepatocyte damage by modulating oxidative stress and suppressing NF- $\kappa$ B in male rats. **Saudi J Biol Sci**, v. 25, n. 7, p. 1272-1277, 2018.
- ALVES J. L. *et al.* Pulmonary arterial hypertension in the southern hemisphere: results from a registry of incident Brazilian cases. **Chest**, v. 147, n. 2, p. 495-501, 2015.
- ARCHER S. L. *et al.* Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target. **Circulation**, v. 121, n. 24, p. 2661-71, 2010.
- ARRANZ S. *et al.* Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. **Nutrients**, v. 4, p. 759–781, 2012.
- AUGUSTINE D.X. *et al.* Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension: a guideline protocol from the British Society of Echocardiography. **Echo Res Pract**, v. 5, n. 3, p. G11-G24, 2018.
- AWDISH R.; CAJIGAS H. Definition, epidemiology and registries of pulmonary hypertension. **Heart Fail Rev**, v. 21, n. 3, p. 223-8, 2016.
- BADESCH D.B. *et al.* Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 54, n. 1, p. S55-66, 2009.
- BADESCH D.B. *et al.* Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL registry. **Chest**, v. 137, n. 2, p. 376-87, 2010.
- BARBOSA P.O. *et al.* Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp dietary intake improves cellular antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women. **Nutrition**, v. 32, p. 674-680, 2016.



BARMAN S. A.; ZHU S.; WHITE R. E. RhoA/Rho-kinase signaling: a therapeutic target in pulmonary hypertension. **Vasc Health Risk Manag**, v. 5, p. 663-71, 2009.

BARST R.J. *et al.* Updated evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 54, n. 1, p. S78-84, 2009.

BARST, R. J. Hipertensão Pulmonar. In: GOLDMAN, L. Goldman Cecil Medicina. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, 529-537.

BASU A. *et al.* Berries: emerging impact on cardiovascular health. **Nutr Rev**, v. 68, n. 3, p. 168-177, 2010.

BOEING H. *et al.* Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. **Eur J Nutr**, v. 51, n. 6, p. 637-663, 2012.

BOSSONE E. *et al.* Echocardiographic features of primary pulmonary hypertension. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 12, n. 8, p. 655-62, 1999.

BOVERIS A.; CHANCE B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J**, v. 134, n. 3, p. 707-16, 1973.

BRAULT L. *et al.* PIM serine/threonine kinases in the pathogenesis and therapy of hematologic malignancies and solid cancers. **Haematologica**, v. 95, n. 6, p. 1004-1015, 2010.

BRISTOW M.R. *et al.* Beta-adrenergic neuroeffector abnormalities in the failing human heart are produced by local rather than systemic mechanisms. **J Clin Invest**, v. 89, n. 3, p. 803-815, 1992.

BRISTOW M.R., QUAIFFE R.A. The adrenergic system in pulmonary arterial hypertension: bench to bedside (2013 Grover Conference series). **Pulm Circ**, v. 5, n. 3, p. 415-423, 2015.

BURG E. D. *et al.* Potassium channels in the regulation of pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis: pharmacotherapeutic implications. **Br J Pharmacol**, v. 153, n. S1, p. S99-111, 2008.

CALLERA G.E. *et al.* ETA receptor blockade decreases vascular superoxide generation in DOCA-salt hypertension. **Hypertension**, v. 42, n. 4, p. 811-817, 2003.

CANTUARIAS-AVILÉS T. *et al.* Cultivo do mirtilo: atualizações e desempenho inicial de variedades de baixa exigência em frio no Estado de São Paulo. **Rev. Bras. Frutic**, v. 36, n. 1, p. 139-147, 2014.

CAO C. *et al.* AMP-activated protein kinase contributes to UV- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in human skin keratinocytes. **J Biol Chem**, v. 283, n. 43, p. 28897-28908, 2008.

CETIN M. *et al.* Relationship between severity of pulmonary hypertension and coronary sinus diameter. **Rev Port Cardiol**, v. 34, n. 5, p. 329-35, 2015.

CHEN L. *et al.* Hydrogen peroxide inhibits mTOR signaling by activation of AMPK alpha leading to apoptosis of neuronal cells. **Lab Invest**, v. 90, n. 5, p. 762-773, 2010.

CHEN Y. *et al.* Activation of Nrf2 Attenuates Pulmonary Vascular Remodeling via Inhibiting Endothelial-to-Mesenchymal Transition: an Insight from a Plant Polyphenol. **Int J Biol Sci**, 2017; 13(8): 1067–1081.

CHIRIBAU C.B. *et al.* FOXO3A regulates peroxiredoxin III expression in human cardiac fibroblasts. **J Biol Chem**, v. 283, n. 13, p. 8211-8217, 2008.

CHRISTMAN B. W. *et al.* An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. **N Engl J Med**, v. 327, n. 2, p. 70-5, 1992.

CHU W. *et al.* In: Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2<sup>a</sup> edição. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011. Capítulo 4.

CRABTREE M. J. *et al.* Quantitative regulation of intracellular endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) coupling by both tetrahydrobiopterin-eNOS stoichiometry and biopterin redox status: insights from cells with tet-regulated GTP cyclohydrolase I expression. **J Biol Chem**, v. 284, n. 2, p.1136-44, 2009.

CRACOWSKI J. L. *et al.* Independent association of urinary F2-isoprostanes with survival in pulmonary arterial hypertension. **Chest**, v. 142, n. 4, p. 869-76, 2012.

CUI B. *et al.* CPU0213, a non-selective ETA/ETB receptor antagonist, improves pulmonary arteriolar remodeling of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 36, n. 2, p. 169-75, 2009.

CURTIS P.J. *et al.* Blueberries improve biomarkers of cardiometabolic function in participants with metabolic syndrome-results from a 6-month, double-blind, randomized controlled trial. **Am J Clin Nutr**, v. 109, n. 6, p. 1535-1545, 2019.

DAHAL B. K. *et al.* Involvement of mast cells in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **Respir Res**, v. 12, p.60, 2011.

DARZYNKIEWICZ Z. *et al.* Fluorochrome-labeled inhibitors of caspases: convenient in vitro and in vivo markers of apoptotic cells for cytometric analysis. **Methods Mol Biol**. v. 682, p. 103-14, 2011.

DAVIE N. *et al.* ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 165, n. 3, p. 398-405, 2002.

DEMARCO V. G. *et al.* Oxidative stress contributes to pulmonary hypertension in the transgenic (mRen2)27 rat. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 294, n. 6, p. 2659-68, 2008.

DERUELLE P.; GROVER T. R.; ABMAN S. H. Pulmonary vascular effects of nitric oxide-cGMP augmentation in a model of chronic pulmonary hypertension in fetal and neonatal sheep. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 289, n. 5, p. L798-806, 2005.

DORN G.W. II; Force T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. **J Clin Invest**, v. 115, n. 3, p. 527-537, 2005.

ECKEL R.H. *et al.* 2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. **Circulation**, v. 129, p. S76- 99, 2014.

ELADWY R.A. *et al.* Mechanistic insights to the cardioprotective effect of blueberry nutraceutical extract in isoprenaline-induced cardiac hypertrophy. **Phytomedicine**, v. 51, p. 84-93, 2018.

ELKS C.M. *et al.* A blueberry-enriched diet attenuates nephropathy in a rat model of hypertension via reduction in oxidative stress. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24028, 2011.

FALCÃO-PIRES I. *et al.* Apelin decreases myocardial injury and improves right ventricular function in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 296, n. 6, p. H2007-14, 2009.

FORFIA P.R. *et al.* Tricuspid annular displacement predicts survival in pulmonary hypertension. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 174, p. 1034-41, 2006.

FRAZZIANO G. *et al.* Nox-derived ROS are acutely activated in pressure overload pulmonary hypertension: indications for a seminal role for mitochondrial Nox4. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 306, n. 2, p. H197-205, 2014.

GAINE S. P., RUBIN L. J. Primary pulmonary hypertension. **Lancet**, v. 352, n. 9129, p. 719-25, 1998.

GALDERISI M. Diastolic dysfunction and diastolic heart failure: diagnostic, prognostic and therapeutic aspects. **Cardiovasc Ultrasound**, v. 4, p. 3-9, 2005.

GERACI M. W. *et al.* Gene expression patterns in the lungs of patients with primary pulmonary hypertension: a gene microarray analysis. **Circ Res**, v. 88, n. 6, p. 555-62, 2001.

GHOFRANI H. A.; OSTERLOH I. H.; GRIMMINGER F. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 8, p. 689-702, 2006.

GIAID A.; SALEH D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. **N Engl J Med**, v. 333, n. 4, p. 214-21, 1995.

GOMEZ-ARROYO J. *et al.* A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: problems and prospects. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 302, n. 10, p. L977-991, 2012.

GOMEZ-ARROYO J. G. *et al.* The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 302, n. 4, p. L363-9, 2012.

GONÇALVES H. *et al.* Analysis of heart rate variability in a rat model of induced pulmonary hypertension. **Med Eng Phys**, v. 32, n. 7, p. 746-52, 2010.

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

GUSTAFSON S.J. *et al.* A nonpolar blueberry fraction blunts NADPH oxidase activation in neuronal cells exposed to tumor necrosis factor- $\alpha$ . **Oxid Med Cell Longev**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

HABIB G.; TORBICKI A. The role of echocardiography in the diagnosis and management of patients with pulmonary hypertension. **Eur Respir Rev**, v. 19, n. 118, p. 288-99, 2010.

HAGA S. *et al.* Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. **J Clin Invest**, v. 112, n. 7, p. 989-998, 2003.

HARDZIYENKA M. *et al.* Sequence of Echocardiographic Changes During Development of Right Ventricular Failure in Rat. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 19, n. 10, p. 1272-9, 2006.

HE J. *et al.* Galectin-3 mediates the pulmonary arterial hypertension-induced right ventricular remodeling through interacting with NADPH oxidase 4. **J Am Soc Hypertens**, v. 11, n. 5, p. 275-289, 2017.

HEMNES A.R., BRITTAIN E.L. Autonomic Nervous System in Pulmonary Arterial Hypertension: Time to Rest and Digest. **Circulation**, v. 137, n. 9, p. 925-927, 2018.

HOEPER M. M. *et al.* Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 24, n. 62, p. 42-50, 2013.

HOWARD L.S. *et al.* Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension: standard operating procedure. **Eur Respir Rev**, v. 21, n. 125, p. 239-48, 2012.

HU W. *et al.* Blueberry anthocyanin-enriched extract ameliorates transverse aortic constriction-induced myocardial dysfunction via the DDAH1/ADMA/NO signaling pathway in mice. **Mol Med Rep**, *no prelo*, 2019.

HUMBERT M. *et al.* Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 43, n. 12, p. S13-24, 2004.

HUMBERT M. *et al.* Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 173, n. 9, p. 1023-30, 2006.

INTENGAN H.D., SCHIFFRIN E.L. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis and fibrosis. **Hypertension**, v. 38, p. 581-587, 2001.

ISHIKAWA M. *et al.* Effects of a pure alpha/beta-adrenergic receptor blocker on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension with right ventricular hypertrophy in rats. **Circ J**, v. 73, n. 12, p. 2337-2341, 2009.

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

KARUPPIAH K. *et al.* Suppression of eNOS-derived superoxide by caveolin-1: a biopterin-dependent mechanism. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 301, n. 3, p. H903-11, 2011.

KIMURA K. *et al.* Evaluation of right ventricle by speckle tracking and conventional echocardiography in rats with right ventricular heart failure. **Int Heart J**, v. 56, n. 3, p. 349-53, 2015.

KITABATAKE A. *et al.* Noninvasive evaluation of pulmonary hypertension by a pulsed Doppler technique. **Circulation**, v. 68, n. 2, p. 302-9, 1983.

KLEIN D., KERN R.M., SOKOL R.Z. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. **Biochem Mol Biol Int**, v. 36, p. 59-66, 1995.

KLOTZ L.O. *et al.* Redox regulation of FoxO transcription factors. **Redox Biol**, v. 6, p. 51-72, 2015.

KODUR S. *et al.* Influence of Age on Outcome in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. **Heart Lung Circ**, v. 24, n. 7, p. 719-23, 2015.

KOSKENVUO J.W. *et al.* A comparison of echocardiography to invasive measurement in the evaluation of pulmonary arterial hypertension in a rat model, **Int J Cardiovasc Imaging**, v. 26, p. 509-518, 2010.

LACERDA D.S. *et al.* Pterostilbene reduces oxidative stress, prevents hypertrophy and preserves systolic function of right ventricle in cor pulmonale model, **Br J Pharmacol**, v. 174, p. 3302-3314, 2017.

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

LANG R.M. *et al.* Recommendations for chamber quantification. **Eur J Echocardiogr**, v. 7, n. 2, p. 79-108, 2006.

LAUNAY J. M. *et al.* Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. **Nat Med**, v. 8, n. 10, p. 1129-35, 2002.

LAZZÈ M.C. *et al.* Anthocyanidins decrease endothelin-1 production and increase endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. **Mol Nutr Food Res**, v. 50, p. 44-51, 2006.

Lebel C.P. *et al.* Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. **Chem Res Toxicol**, v. 5 p. 227-231, 1992.

LEHRMAN *et al.* Primary pulmonary hypertension and cor pulmonale. **Cardiol Rev**, v. 10, n. 5, p. 265-78, 2002.

LIMA-SEOLIN B.G. *et al.* Bucindolol Modulates Cardiac Remodeling by Attenuating Oxidative Stress in H9c2 Cardiac Cells Exposed to Norepinephrine. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2019, p. 6325424, 2019.

LIU B. *et al.* Preventive Effect of Blueberry Extract on Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride in Mice. **Foods**, v. 8, n. 2, 2019.

LIU L.K. *et al.* Mulberry anthocyanin extracts inhibit LDL oxidation and macrophage-derived foam cell formation induced by oxidative LDL. **J Food Sci**, v. 73, p. H113–H121, 2008.

LIU Y *et al.* Blueberry Anthocyanins-Enriched Extracts Attenuate Cyclophosphamide-Induced Cardiac Injury. **PLoS One**, v. 10, n.7, p. e0127813, 2015.

LLESUY S.F. *et al.* Myocardial damage induced by doxorubicins: hydroperoxide-initiated chemiluminescence and morphology. **Free Radic Biol Med**, v. 8, p. 259-64, 1990.

LOUIS X.L. *et al.* Blueberry polyphenols prevent cardiomyocyte death by preventing calpain activation and oxidative stress. **Food Funct**, v. 5, n. 8, p. 1785-94, 2014.

LOWRY O. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUND A.K. *et al.* Endothelin-1–Mediated Increase in Reactive Oxygen Species and NADPH Oxidase Activity in Hearts of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Null Mice. **Toxicol Sci**, v. 88, n. 1, p. 265-73, 2005.

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

MANES A. *et al.* Female gender and pulmonary arterial hypertension: a complex relationship. **G Ital Cardiol**, v. 13, n. 6, p. 448-60, 2012.

MARKLUND S., MARKLUND G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, **Eur J Biochem**, v. 47, p. 469-474, 1974.

MASRI F.A. *et al.* Deficiency of lung antioxidants in idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Clin Transl Sci**, v. 1, p. 99-106, 2008.

MATTHEW R. *et al.* Effects of monocrotaline on endothelial nitric oxide synthase expression and sulfhydryl levels in rat lungs. **Heart Dis**, v. 4, n. 3, p. 152-158, 2002.

MCGOON M. D. *et al.* Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. **J Am Coll Cardiol**, v. 65, n. 1, p. D51-9, 2013.

MCMULLEN J.R. *et al.* Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. **Circulation**, v. 109, n. 24, p. 3050-3055, 2004.

MILLS G.C. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. **J Biol Chem**, v. 229, p. 189-97, 1957.

MINK P.J. *et al.* Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. **Am J Clin Nutr**, v. 85, n. 3, p. 895-909, 2007.

MOCUMBI A. O.; THIENEMANN F.; SLIWA K. A global perspective on the epidemiology of pulmonary hypertension. **Can J Cardiol**. v. 31, n. 4, p. 375-81, 2015.

MONTANI D. *et al.* Targeted therapies in pulmonary arterial hypertension. **Pharmacol Ther**, v. 141, n. 2, p. 172-91, 2014.

MORESCO H.H. *et al.* Myricitrin as the main constituent of two species of Myrcia, **J Appl Pharm Sci**, v. 4, p. 1-7, 2014.

MORITA M. *et al.* Antioxidant capacity of blueberry extracts: Peroxyl radical scavenging and inhibition of plasma lipid oxidation induced by multiple oxidants. **Journal of Berry Research**, v. 7, p. 1-9, 2017.

MORRIS B.J. *et al.* FOXO3: A Major Gene for Human Longevity--A Mini-Review. **Gerontology**, v. 61, n. 6, p. 515-525, 2015.

MOSELE F. *et al.* Effects of purple grape juice in the redox-sensitive modulation of right ventricular remodeling in a pulmonary arterial hypertension model. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 60, n. 1, p. 15-22, 2012.

MOZAFFARIAN D. Dietary and Policy Priorities for Cardiovascular Disease, Diabetes, and Obesity: A Comprehensive Review. **Circulation**, v. 133, p. 187-225, 2016.

NAEJIE R., MANES A. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension. **Eur Respir Rev**, v. 23, n. 134, p. 476-87, 2014.

NERI M. *et al.* Correlation between cardiac oxidative stress and myocardial pathology due to acute and chronic norepinephrine administration in rats. **J Cell Mol Med**, v. 11, n. 1, p.156-70, 2007.

NISBET R. E. *et al.* Rosiglitazone attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in a mouse model. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 42, n. 4, p. 482-90, 2010.

NOGUEIRA-FERREIRA R. *et al.* Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 35, p. 8-16, 2015.

NOZIK-GRAYCK E. *et al.* Lung EC-SOD overexpression attenuates hypoxic induction of Egr-1 and chronic hypoxic pulmonary vascular remodeling. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 295, n. 3, p. L422-30, 2008.

OGAWA A.; EJIRI K.; MATSUBARA H. Long-term patient survival with idiopathic/heritable pulmonary arterial hypertension treated at a single center in Japan. **Life Sci**, v. 118, n. 2, p. 414-9, 2014.

OH H.M. *et al.* STAT3 protein interacts with Class O Forkhead transcription factors in the cytoplasm and regulates nuclear/cytoplasmic localization of FoxO1 and FoxO3a proteins in CD4(+) T cells. **J Biol Chem**, v. 287, n. 36, p. 30436-30443, 2012.

OKUMURA K. *et al.* Carvedilol improves biventricular fibrosis and function in experimental pulmonary hypertension. **J Mol Med (Berl)**, v. 93, n. 6, p. 663-74, 2015.

OKUMURA K. *et al.* Right ventricular diastolic performance in children with pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease: correlation of echocardiographic parameters with invasive reference standards by high-fidelity micromanometer catheter. **Circ Cardiovasc Imaging**, v. 7, p. 491-501, 2014.

PEACOCK A. J. *et al.* An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. **Eur Respir J**, vol. 30, n. 1, p. 104-9, 2007.

PEPKE-ZABA J., MORRELL N.W. The endothelin system and its role in pulmonary arterial hypertension (PAH). **Thorax**, v. 60, n. 6, p. 443-4, 2005.

PERK J. *et al.* European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). **Eur Heart J**, v. 33, n. 13, p. 1635-701, 2012.

PERTUZATTIA P.B. *et al.* Quantification of Several Bioactive Compounds and Antioxidant Activities of Six Cultivars of Brazilian Blueberry. **The Natural Products Journal**, v. 2, p. 188-195, 2012.

POLI V.; CAMPOREALE A. STAT3-Mediated Metabolic Reprogramming in Cellular Transformation and Implications for Drug Resistance. **Front Oncol**, v. 5, p.121, 2015.

PULLAMSETTI S. *et al.* Increased levels and reduced catabolism of asymmetric and symmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension. **FASEB J**, v. 19, n. 9, p. 1175-7, 2015.

RAMESH T., BEGUM V.H. Protective Effect of *Sesbania grandiflora* against cigarette smoke-induced oxidative damage in rats. **J Med Food**, v. 11, p. 369-375, 2008.



REZNICK A.Z., PACKER L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 357-63, 1994.

RICH S. *et al.* Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. **Ann Intern Med**, v. 107, n. 2, p. 216-23, 1987.

RISSANEN T.H. *et al.* Low intake of fruits, berries and vegetables is associated with excess mortality in men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor (KIHD) Study. **J Nutr**, 2003 v. 133, n. 1, p. 199-204, 2003.

RODRIGUES-MATEOS A. *et al.* Intake and time dependence of blueberry flavonoid-induced improvements in vascular function: a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study with mechanistic insights into biological activity. **Am J Clin Nutr**, v. 9, n. 5, p.1179-91, 2013.

RODRIGUEZ-MATEOS A. *et al.* Berry (poly)phenols and cardiovascular health. **J Agric Food Chem**, v. 62, n. 18, p. 3842-3851, 2014.

ROESLER R. *et al.* Antioxidant activity of cerrado fruits, **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 27 p. 53-60, 2007.

RUITER G. *et al.* Reversibility of the monocrotaline pulmonary hypertension rat model. **Eur Respir J**, v. 42, n. 2, p. 553-6, 2013.

RYAN J.J.; MARSBOOM G.; ARCHER S. L. Rodent models of group 1 pulmonary hypertension. **Handb Exp Pharmacol**, v. 218, p. 105-49, 2013.

SAHREEN S. *et al.* Effects of Carissa opaca fruits extracts on oxidative pulmonary damages and fibrosis in rats. **Complement Altern Med**, v. 14, p. 14-40, 2014.

SAVAI R. *et al.* Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 186, n. 9, p. 897-908, 2012.

SCHERMULY R. T. *et al.* Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. **Nat Rev Cardiol**, v. 8, n. 8, p. 443-55, 2011.

SCHNEIDER M.P. *et al.* Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 47, p. 731-59, 2007.

SCHOENTAL R., HEAD M. A. Pathological changes in rats as a result of treatment with monocrotaline. **Br J Cancer**, v. 9, n. 1, p. 229-37, 1955.

SEERAM N.P. Berry fruits: Compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. **J Agric Food Chem**, v. 56, p. 627-629, 2008.

SENGUPTA A. *et al.* FoxO transcription factors promote cardiomyocyte survival upon induction of oxidative stress. **J Biol Chem**, v. 28, n. 9, p. 7468-7478, 2001.

SHAH M.; PATEL K.; SEHGAL P. B. Monocrotaline pyrrole-induced endothelial cell megalocytosis involves Golgi blockade mechanism. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 288, n. 4, p. C850-C862, 2005.

SHARMA S. *et al.* Altered carnitine homeostasis is associated with decreased mitochondrial function and altered nitric oxide signaling in lambs with pulmonary hypertension. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 294, n. 1, p. L46-56, 2008.

SHARMA S. *et al.* Role of oxidized lipids in pulmonary arterial hypertension. **Pulm Circ**, v. 6, p. 261-73, 2016.

SHEN W. H. *et al.* Cardiac restricted overexpression of kinase-dead mammalian target of rapamycin (mTOR) mutant impairs the mTOR-mediated signaling and cardiac function. **J Biol Chem**, v. 283, n. 13842-13849, 2008.

SHI Y. *et al.* Roles of STAT3 in leukemia (Review). **Int J Oncol**, v. 53, n. 1, p. 7-20, 2018.

SID B. *et al.* Role of AMPK activation in oxidative cell damage: Implications for alcohol-induced liver disease. **Biochem Pharmacol**, v. 86, n. 2, p. 200-209, 2013.

SIES, H. Total antioxidant capacity: appraisal of a concept. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 6, p. 1493–1495, 2007.

SILVA S. *et al.* Health promoting properties of blueberries: a review. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 29, p. 1-20, 2018.

SIMONNEAU G. *et al.* Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 24, n. 62, p. 34-41, 2013.

SONG Y. *et al.* Effects of blueberry anthocyanins on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes through Nrf2/HO-1 signaling. **J Neuroimmunol**, v. 301, p. 1-6, 2016.

SOUZA-RABBO M. *et al.* Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 35, n. 8, p. 944-948, 2008.

SPIEKERMANN S.; SCHENK K.; HOEPER M. M. Increased xanthine oxidase activity in idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Eur Respir J**, v. 34, n. 1, p. 276, 2009.

SPOHR L. *et al.* Combined actions of blueberry extract and lithium on neurochemical changes observed in an experimental model of mania: exploiting possible synergistic effects. **Metab Brain Dis**, v. 34, p. 605-619, 2019.

STENMARK K. R. *et al.* Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 297, n. 6, p. L1013-32, 2009.

SUN Y. *et al.* Blueberry extract attenuates doxorubicin-induced damage in H9c2 cardiac cells. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 97, n. 9, p. 880-88, 2019.

SUTENDRA G. *et al.* Fatty acid oxidation and malonyl-CoA decarboxylase in the vascular remodeling of pulmonary hypertension. **Sci Transl Med**, v. 2, n. 44, p. 44-58, 2010.

TABIMA D. M.; FRIZZELL S.; GLADWIN M. T. Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. **Free Radic Biol Med**, v. 52, n. 9, p. 1970-1986, 2012.

TAN D. *et al.* Blueberry anthocyanins-enriched extracts attenuate the cyclophosphamide-induced lung toxicity. **Chem Biol Interact**, v. 222, p. 106-111, 2014.

TANGNEY C., RASMUSSEN H.E. Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. **Curr Atheroscler Rep**, v. 15, p. 324, 2013.

TONEY B.M. *et al.* Selective endothelin-A receptor blockade attenuates endotoxin-induced pulmonary hypertension and pulmonary vascular dysfunction. **Pulm Circ**, v. 4, n. 2, p. 300-10, 2014.

TOURNIER A. *et al.* Calibrated automated thrombography demonstrates hypercoagulability in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Thromb Res**, v. 126, n. 6, p. 418-22, 2010.

TRESSERRA-RIMBAU A. *et al.* Inverse association between habitual polyphenol intake and incidence of cardiovascular events in the PREDIMED study. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 24, p. 639–647, 2014.

TÜRCK P. *et al.* Trapidil improves hemodynamic, echocardiographic and redox state parameters of right ventricle in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension model. **Biomed Pharmacother**, v. 103, p.182-190, 2018.

UETI O. M. *et al.* Assessment of right ventricular function with Doppler echocardiographic indices derived from tricuspid annular motion: comparison with radionuclide angiography. **Heart**, v. 88, n. 3, p. 244-8, 2002.

VAILLANCOURT M. *et al.* Autonomic nervous system involvement in pulmonary arterial hypertension. **Respir Res**, v. 18, n. 1, p. 201, 2017.

VANWINKLE W.B. *et al.* Cytoskeletal alterations in cultured cardiomyocytes following exposure to the lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal. **Cell Motil Cytoskeleton**, v. 28, n. 2, p. 119-134, 1994.

VITA J.A. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. **Am J Clin Nutr**, v. 81, p. 292–297, 2005.

VOELKEL N. F. *et al.* Pathobiology of pulmonary arterial hypertension and right ventricular failure. **Eur Respir J**, v. 40, n. 6, p. 1555-65, 2012.

VOLPE S.L. *et al.* Fruit and Vegetable Intake and Prevention of Chronic Disease. **ACSM's Health & Fitness Journal**, v. 23, n. 3, p. 30-31, 2019.

- WANG Y. *et al.* Superoxide dismutases: dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling, **J Cell Biol**, v. 217, p. 1915-1928, 2018.
- WANG Z. *et al.* Blueberry Anthocyanin-Enriched Extracts Attenuate Fine Particulate Matter (PM2.5)-Induced Cardiovascular Dysfunction. **J Agric Food Chem**, v. 65, n.1, p. 87-94, 2017.
- WEI Y. *et al.* Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. **J Biol Chem**, v. 281, p. 35137-35146, 2006.
- WENSEL R. *et al.* Impaired cardiac autonomic control relates to disease severity in pulmonary hypertension. **Eur Respir J**, v. 34, n. 4, p. 895-901, 2009.
- WEST J.; HEMNES A. Experimental and transgenic models of pulmonary hypertension. **Compr Physiol**, v. 1, n. 2, p. 769-82, 2011.
- WILLIAMS C.M. *et al.* Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. **Free Radic Biol Med**, v. 45, n. 3, p. 295-305, 2008.
- WILSON D. W. *et al.* Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. **Microvasc Res**, v. 38, n. 1, p. 57-80, 1989.
- WOLIN M. S.; AHMAD M.; GUPTA S.A. The sources of oxidative stress in the vessel wall. **Kidney Int**, v. 67, n. 5, p. 1659-61, 2005.
- WONG C.M. *et al.* Reactive oxygen species and antioxidants in pulmonary hypertension. **Antioxid Redox Signal**, v.18, p. 1789-96, 2013.
- World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs) fact sheet. WHO. [citado em 25 de novembro de 2019]. [www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
- WUNDERLICH C. *et al.* The adverse cardiopulmonary phenotype of caveolin-1 deficient mice is mediated by a dysfunctional endothelium. **J Mol Cell Cardiol**, v. 44, n. 5, p. 938-47, 2008.
- XUE C.; JOHNS R. A. Endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. **N Engl J Med**, v. 333, n. 24, p. 1642-4, 1995.
- YEN-CHUN L. *et al.* Pulmonary Arterial Hypertension: The Clinical Syndrome. **Circ Res**, v. 115, n. 1, p. 115-30, 2014.
- YIN F.C. *et al.* Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. **Am J Physiol**, v. 243, n. 6, p. H941-7, 1982.
- YOUDIM K.A. *et al.* Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. **J Nutr Biochem**, v. 13, p. 282–288, 2002.
- YU C. M. *et al.* Right Ventricular Diastolic Dysfunction in Heart Failure. **Circulation**, v. 93, n. 8, p. 1509-14, 1996.

YUN W. *et al.* Protective effects of hydrogen-rich saline on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in a rat model. **Respir Res**, v. 4, p. 12-26, 2011.

ZAFRA-STONE S. *et al.* Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. **Mol Nutr Food Res**, v. 51, p. 675-683, 2007.

ZEN-GUO L. *et al.* Sulfhydryl involvement in nitric oxide sequestration and nitric oxide induced guanylyl cyclase activation in vascular smooth muscle. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 73, p. 1144-1148, 1995.

ZHANG D. *et al.* mTORC1 regulates cardiac function and myocyte survival through 4E-BP1 inhibition in mice. **J Clin Invest**, v. 120, n. 8, p. 2805-2816, 2010.

ZHU Y.P. *et al.* Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates IL-10-mediated anti-inflammatory signaling pathways in macrophages. **J Immunol**, v. 19, n. 2, p. 584-594, 2015.

ZIMMER A. *et al.* Effects of aerobic exercise training on metabolism of nitric oxide and endothelin-1 in lung parenchyma of rats with pulmonary arterial hypertension. **Mol Cell Biochem**, v. 42, n. 1-2, p. 73-89, 2017.



## CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 32192

Título: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO DE MIRTILO SOBRE O VENTRÍCULO DIREITO DE RATOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA

Vigência: 01/12/2016 à 01/11/2020

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ALEX SANDER DA ROSA ARAUJO - coordenador desde 01/12/2016

PATRICK TURCK - Aluno de Doutorado desde 01/12/2016

**Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 23/01/2017 - SALA 330 DO ANEXO - PRÉDIO DA REITORIA DA UFRGS/CAMPUS CENTRO/UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 162 ratos Wistar machos, com 200 gramas de massa corporal, provenientes do CREAL/UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.**

Porto Alegre, Sexta-Feira, 17 de Fevereiro de 2017

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA  
Vice Coordenador da comissão de ética