

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA**

**Cristiano Urbano Becker**

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO  
NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL  
PULMONAR.**

**Porto Alegre  
2010**

**Cristiano Urbano Becker**

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO  
NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL  
PULMONAR.**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado a Escola de Educação  
Física da UFRGS como requisito parcial  
para obtenção de grau em Educação  
Física – Bacharelado.

Orientadora: Adriane Belló-Klein

**Porto Alegre**

**2010**

**Cristiano Urbano Becker**

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO  
NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL  
PULMONAR.**

Conceito Final:

Aprovado em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. \_\_\_\_\_-UFRGS

Orientadora – Profa. Dra. Adriane Belló-Klein – UFRGS

## AGRADECIMENTOS

Ao longo desses quatro anos, a pessoa a quem mais dedico o resultado de toda esta trajetória é a minha mãe. Obrigado por me apoiar em todos os sentidos e batalhar, dia após dia, na ambição de ver o seu filho progredir.

Agradeço, também, ao meu pai, que, de alguma forma, em algum lugar, permanece me ajudando, e a ele cultivarei um carinho eterno.

Agradeço a todos os amigos, tanto os da ESEF como os de fora, que, em algum momento, me ajudaram ou estiveram presentes em momentos alegres e tristes. Aos da ESEF, sempre me lembrarei da Alieza, do Átila, da Natália, dos meus “bixos” favoritos – Aline, Joanna, Inaê, Maicon e Gabriela – e, especialmente, da Cíntia e do Cristiano, grandes amigos presentes nos momentos mais difíceis do curso e da minha vida pessoal.

Aos amigos de fora da ESEF, gostaria de agradecer pelo companheirismo de sempre. Mesmo distantes, mantivemo-nos unidos. Portanto, Joseane, Jones, Antônio, Tainã, Marina, Ângela, Viviane, Letticia, Venúcia, Diego, Stephanie, Bruno e Gabriela, muito obrigado.

Sou muito grato às amizades conquistadas no laboratório de fisiologia cardiovascular. É ótimo trabalhar em um ambiente em que todos se dão bem. Professora Adriane, obrigado por ser, mais do que uma orientadora de pesquisa, uma orientadora pessoal, uma conselheira, uma amiga. Rafael e Rafaela, agradeço a vocês, amigos, por terem participado de momentos importantes durante esses anos e por se manterem ao meu lado. A todos os outros colegas e amigos – Cristina, Bruno, Luciana, Maristela, Dhãniel, Tânia, Alex, Roberta, Paulo, Mariane, Gustavo, Amanda - também só tenho a dizer “obrigado” por participarem dessa parte do meu percurso. Estarei sempre à disposição de vocês.

Agradeço também a duas outras companheiras profissionais, Karina e Gabriela, as quais, ao longo do tempo, mostraram-se grandes amigas. Que façamos ainda muitas outras pesquisas envolvendo análise espectral.

Por fim, não menos importante, agradeço à ESEF por esses quatro anos e a alguns professores que foram muito importantes para mim – Flávio, Álvaro, Claudia e Adriane -, os quais pretendo me espelhar, futuramente, como um bom exemplo de profissional da Educação Física.

## RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o estresse oxidativo (EO) na musculatura esquelética de ratos com hipertensão arterial pulmonar (HAP) induzida por monocrotalina (MCT) submetidos a um treinamento físico aeróbio. Foram utilizados 34 ratos Wistar, divididos em quatro grupos: controle sedentário (CS), monocrotalina sedentário (MS), controle treinado (CT) e monocrotalina treinado (MT). Os animais dos grupos MS e MT receberam uma injeção de MCT i.p. (60mg/kg) e, então, iniciou-se o período de treinamento físico para os grupos CT e MT, durante 4 semanas (5x/semana, 50 minutos, 60% do  $VO_2$  máx.). Após, os animais foram anestesiados, a pressão ventricular direita mensurada, e, então, sacrificados, coletando-se o coração e o músculo gastrocnêmio, para análises morfométricas e de EO, respectivamente. Os animais tratados com MCT apresentaram um aumento nas pressões ventriculares direita, bem como nos índices de hipertrofia do coração e do ventrículo direito em relação aos seus controles. O exercício físico reduziu apenas a pressão ventricular diastólica direita dos MT em relação aos MS. Em relação ao EO, os níveis de peróxido de hidrogênio, no gastrocnêmio, aumentaram nos animais com HAP, em relação a seus controles. Esse aumento foi ainda maior no grupo MT em relação ao MS, sendo o único grupo a apresentar lipoperoxidação. Apesar disso, a relação GSH/GSSG não demonstrou diferenças entre os grupos, indicando que não ocorreu desbalanço redox. A atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase também não apresentaram diferenças. O exercício físico, portanto, parece não interferir positivamente sobre a musculatura esquelética dos animais com HAP, gerando, inclusive, dano lipídico. Novas investigações devem ser feitas a fim de um melhor entendimento sobre como o exercício pode interferir sobre essa doença.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the oxidative stress (OS) in skeletal muscle of rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension (PAH) which underwent exercise training. We used 34 Wistar rats, which were divided into four groups: sedentary control (SC) sedentary monocrotaline (SM), trained control (TC) and trained monocrotaline (TM). Animals in SM and TM groups received an i.p. injection of MCT (60mg/kg) and then began the period of physical training for the TM and TC groups for 4 weeks (5 days per week, 50 minutes, 60% of  $VO_2$  max.). After the period, the animals were anesthetized, the right ventricular pressure measured, and then they were sacrificed, being collected the heart and gastrocnemius muscle for morphometric and OS analysis, respectively. Animals treated with MCT showed an increase in right ventricular pressures, as well as in rates of heart and hypertrophy of the right ventricle in relation to the controls. Exercise reduced only diastolic right ventricular pressure of TM in relation to SM. Regarding the OS, the levels of hydrogen peroxide on gastrocnemius increased in animals with PAH, compared to their controls. This increase was even greater in the TM group compared to SM, being the only group to show lipoperoxidation. Nevertheless, the GSH/GSSG showed no differences between groups, indicating that no redox imbalance occurred. The activity of catalase and superoxide dismutase also showed no significant differences. The exercise, therefore, seems not to interfere positively on the skeletal muscles of animals with PAH, which generated some lipid damage. Further investigations should be made in order to better understand how exercise can impact this disease.

**LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

<b>CAT</b>	<b>Catalase</b>
<b>CS</b>	<b>Controle Sedentário</b>
<b>CT</b>	<b>Controle Treinado</b>
<b>DPOC</b>	<b>Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica</b>
<b>EROs</b>	<b>Espécies Reativas de Oxigênio</b>
<b>GPx</b>	<b>Glutaciona Peroxidase</b>
<b>GSH</b>	<b>Glutaciona Reduzida</b>
<b>GSSG</b>	<b>Glutaciona Oxidada</b>
<b>HAP</b>	<b>Hipertensão Arterial Pulmonar</b>
<b>HP</b>	<b>Hipertensão Pulmonar</b>
<b>IC</b>	<b>Insuficiência Cardíaca</b>
<b>IHC</b>	<b>Índice de Hipertrofia Cardíaca</b>
<b>MCT</b>	<b>Monocrotalina</b>
<b>MS</b>	<b>Monocrotalina Sedentário</b>
<b>MT</b>	<b>Monocrotalina Treinado</b>
<b>PDFVD</b>	<b>Pressão Diastólica Final Ventricular Direita</b>
<b>PSVD</b>	<b>Pressão Sistólica Ventricular Direita</b>
<b>QL</b>	<b>Quimiluminescência</b>
<b>SOD</b>	<b>Superóxido Dismutase</b>
<b>UFRGS</b>	<b>Universidade Federal do Rio Grande do Sul</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE</b>	<b>20</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>21</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1 Animais.....</b>	<b>22</b>
<b>4.2 Cálculo Amostral.....</b>	<b>22</b>
<b>4.3 Grupos Experimentais.....</b>	<b>22</b>
<b>4.4 Protocolo Experimental.....</b>	<b>23</b>
<b>4.5 Protocolo de Treinamento.....</b>	<b>24</b>
<b>4.6 Considerações Éticas na vivisseção dos animais.....</b>	<b>25</b>
<b>4.7 Avaliação da doença.....</b>	<b>25</b>
4.7.1 Avaliação Hemodinâmica.....	25
4.7.2 Hipertrofia Cardíaca.....	25
<b>4.8 Análise do Estresse Oxidativo.....</b>	<b>26</b>
4.8.1 Relação GSH/GSSG.....	26
4.8.2 Quimiluminescência.....	26
4.8.3 Atividade da Superóxido Dismutase.....	27
4.8.4 Atividade da Catalase.....	28
4.8.5 Medida da concentração de peróxido de hidrogênio.....	28
4.8.6 Quantificação de Proteína.....	28
<b>4.9 Análise Estatística.....</b>	<b>29</b>
<b>4.10 Grau de Severidade dos procedimentos.....</b>	<b>29</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>5.1 Avaliação Hemodinâmica.....</b>	<b>30</b>
5.1.1 Registro de pressão ventricular.....	30
5.1.2 Hipertrofia Cardíaca e do Ventrículo Direito.....	31
<b>5.2 Análise do Estresse Oxidativo.....</b>	<b>33</b>
5.2.1 Lipoperoxidação por Quimiluminescência.....	33



5.2.2 Concentração de Peróxido de Hidrogênio.....	34
5.2.3 Atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase.....	35
5.2.4 Relação da glutathione reduzida pela glutathione oxidada.....	36
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>7 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>42</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>9 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A hipertensão pulmonar (HP) é definida como uma pressão arterial pulmonar média acima de 25mmHg em repouso ou acima de 30mmHg durante o exercício. (Budev et al., 2003). A HP pode ocorrer como um fenômeno isolado ou associado a várias alterações cardiopulmonares e está relacionada a altos níveis de morbidade e mortalidade. Ela é uma condição progressiva caracterizada por um aumento da resistência vascular pulmonar que, em seu processo final, por hipertrofia do ventrículo direito, leva à insuficiência cardíaca e à morte (MATHEW et al., 1995).

A classificação mais atual da HP, apresentada no 4º Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar, em 2008, em Dana Point, a divide em cinco grandes grupos e está listada na Tabela 1:

**Tabela 1 - Classificação clínica da hipertensão pulmonar atualizada (Dana Point, 2008).**

### **1. Hipertensão Arterial Pulmonar**

1.1. HAP Idiopática;

1.2. Hereditária

1.2.1. BMPR2;

1.2.2. ALK 1, endoglin;

1.2.3. Causas desconhecidas;

1.3. Induzida por drogas e toxinas;

1.4. Associada com

1.4.1. Doenças do tecido conectivo;

1.4.2. Infecção por HIV;

1.4.3 Hipertensão Portal;

1.4.4 Insuficiência Cardíaca Congênita;

1.4.5. Esquistossomose;

1.4.6. Anemia hemolítica crônica;

1.5. Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido;

### **2. Hipertensão Pulmonar associada a doenças do coração esquerdo**

2.1. Disfunção sistólica;

2.2. Disfunção diastólica;

2.3. Doença valvular;

### **3. Hipertensão pulmonar associada com doenças pulmonares e / ou hipoxemia**

- 3.1. Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC);
- 3.2. Doença pulmonar intersticial;
- 3.3. Outras doenças pulmonares com padrões restritivos e obstrutivos misturados;
- 3.4. Distúrbios respiratórios do sono;
- 3.5. Distúrbios de hipoventilação alveolar;
- 3.6. Exposição crônica a grandes altitudes;
- 3.7. Anomalias do desenvolvimento pulmonar;

### **4. Hipertensão pulmonar devido a trombose crônica e / ou embólica**

### **5. Hipertensão pulmonar com mecanismos multifatoriais não claros**

- 5.1. Desordens hematológicas;
- 5.2. Desordens sistêmicas;
- 5.3. Desordens metabólicas;
- 5.4. Outros.

**Adaptada de SIMMONEAU et al., Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension, *Journal of the American College of Cardiology*, Vol.54; No.1, Supplement S, 2009.**

Ainda que seja uma doença incomum, a hipertensão pulmonar afeta milhares de pessoas ao redor do mundo. A incidência estimada de hipertensão arterial pulmonar idiopática é de 1 a 2 casos por milhão na população em geral. Durante a infância a condição afeta ambos os gêneros igualmente. Após a puberdade, é mais comum em mulheres do que em homens (razão de 1,7 para 1). Além disso, a hipertensão arterial pulmonar é mais prevalente em pessoas de 20 a 40 anos de idade e a condição não tem predileção racial (RUBIN, 1997).

Em relação às outras classificações da hipertensão pulmonar, a incidência é relativamente comum, mas ainda não diagnosticada. Estimativas reais da prevalência dessas condições são difíceis de se obterem pela alta diversidade de causas identificáveis (NAUSER et al., 2001).

Em pessoas com mais de 50 anos de idade, a *Cor Pulmonale*, conseqüência de uma hipertensão pulmonar não tratada, é a terceira maior desordem cardíaca –

perdendo para doença coronariana e hipertensão arterial sistêmica (PALEVSKY e FISHMAN, 1990).

A *Cor Pulmonale*, é um termo definido pela Organização Mundial de Saúde como uma síndrome, caracterizada pela hipertrofia do ventrículo direito, resultante de doenças que afetam a função e/ou a estrutura dos pulmões, como é o caso da hipertensão pulmonar, exceto quando as alterações pulmonares são secundárias a doenças que afetam o lado esquerdo do coração ou a cardiopatias congênitas (WHO, 1963).

A presença de hipertensão pulmonar com *Cor Pulmonale* geralmente está associada a um pior prognóstico, independente da doença de base. A sobrevivência estimada, na presença de *Cor pulmonale*, é de 45% em dois anos, contra 69% na sua ausência (MACNEE, 1992).

Modelos experimentais de hipertensão pulmonar têm sido criados e caracterizados para estudar e entender seus mecanismos. Pesquisas realizadas têm o intuito de prevenção e tratamento das manifestações clínicas que culminam com a insuficiência cardíaca, pois esta doença permanece sendo responsável por um alto índice de morbidade e mortalidade da população mundial (LUDKE, 2007).

Entre os modelos experimentais de HP, amplamente utilizado é o modelo de monocrotalina (MCT), que produz hipertensão pulmonar, seguida de sobrecarga de pressão no ventrículo direito, hipertrofia ventricular direita e, eventualmente, insuficiência cardíaca congestiva (PAN et al., 1993). Uma única injeção intraperitoneal (60-90mg/kg) de MCT em ratos produz, entre a segunda e terceira semanas subseqüentes, características clínicas que se assemelham à HAP idiopática (JASMIN et al., 2003).

A monocrotalina é um alcalóide pirrolizidínico encontrado nas plantas da espécie *Crotalaria spectabilis* (figura 1.1). Quando ingerida, sofre metabolização no fígado, através do sistema citocromo P450 monooxigenase, convertendo-se à dehidromonocrotalina, que então circula para o parênquima pulmonar (MONNET E CHACHQUES, 2005).

A lesão inicial leva a um aumento da permeabilidade capilar, edema intersticial moderado, fibrose, acúmulo de macrófagos, modificação de pneumócitos II e edema alveolar (WILSON et al., 1992). Tais lesões também resultam em degeneração endotelial ou hiperplasia, hipertrofia da musculatura lisa e edema adventício. Essas mudanças geram como conseqüência um aumento da resistência

vascular pulmonar e carga de pressão sobre o ventrículo direito (MONNET E CHACHQUES, 2005).



**Ilustração 1 - Planta *Crotalaria spectabilis*.**

**Retirada de <http://www.southeasternflora.com/viewfull.asp?picid=8011> em 22/02/2010, às 21:40**

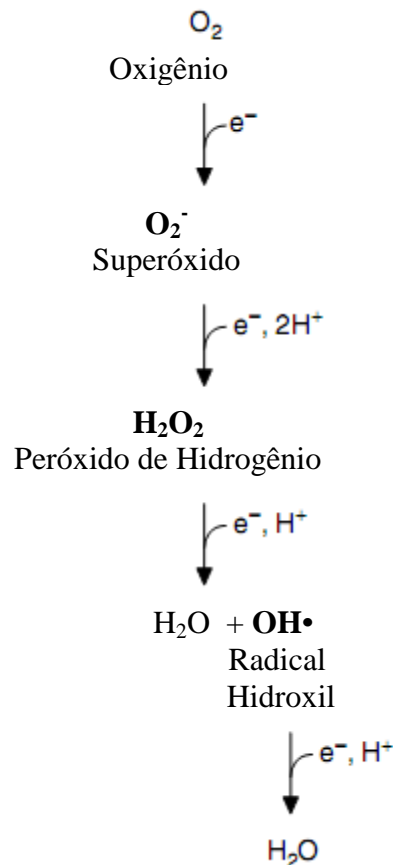
Alguns estudos (PICHARDO et al., 1999; JONG et al., 2000; FARAHMAND et al., 2004) vêm demonstrando em modelos experimentais de *Cor Pulmonale* a participação do estresse oxidativo nos diferentes estágios de desenvolvimento tanto de hipertrofia cardíaca, como de insuficiência cardíaca (IC).

O estresse oxidativo é definido classicamente como um desbalanço entre a produção de agentes oxidantes e de defesas antioxidantes, em favor do primeiro, podendo levar à lesão tecidual e contribuindo para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca tanto em humanos (KAUL, 1993) como em modelos experimentais (KAUL, 1993 e HILL, 1996).

A oxidação é parte fundamental da vida e do metabolismo aeróbio (BARREIROS et al., 2006). A geração de energia necessária ao metabolismo celular ocorre essencialmente na cadeia respiratória mitocondrial. Durante este processo, a molécula de oxigênio é reduzida até ser transformada em água. A redução completa de uma molécula de oxigênio requer quatro elétrons, ocorrendo através do sistema citocromo oxidase (DEL MAESTRO, 1980).

Cerca de 3 a 5% do oxigênio que entra nesta organela, entretanto, sofre uma redução monovalente, ou seja, recebe os quatro elétrons, porém cada um separadamente.

Durante este processo de redução, ocorre a formação de uma série de elementos tóxicos e reativos, as espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) (MENECHINI, 1987).



**Ilustração 2 - Redução monovalente do oxigênio, provocando a formação de espécies reativas de oxigênio. Adaptado de Mark's, 2ª Ed., 2007.**

Além das EROs, existem também outras espécies reativas derivadas de enxofre, carbono e nitrogênio, sendo algumas delas o triclorometil ( $CCl_3^{\cdot}$ ), o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), os tióis, os nitritos ( $NO_2^{\cdot-}$ ), os nitratos ( $NO_3^{\cdot-}$ ) e os peroxinitritos ( $ONOO^{\cdot-}$ ).

Algumas dessas espécies, quando já não o são, podem gerar radicais livres. Denomina-se radical livre qualquer espécie química (átomo ou molécula) capaz de existir independentemente, que possua um ou mais elétrons desemparelhados em qualquer orbital, normalmente no orbital mais externo (DEL MAESTRO, 1980; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999). É importante ressaltar que nem todas as

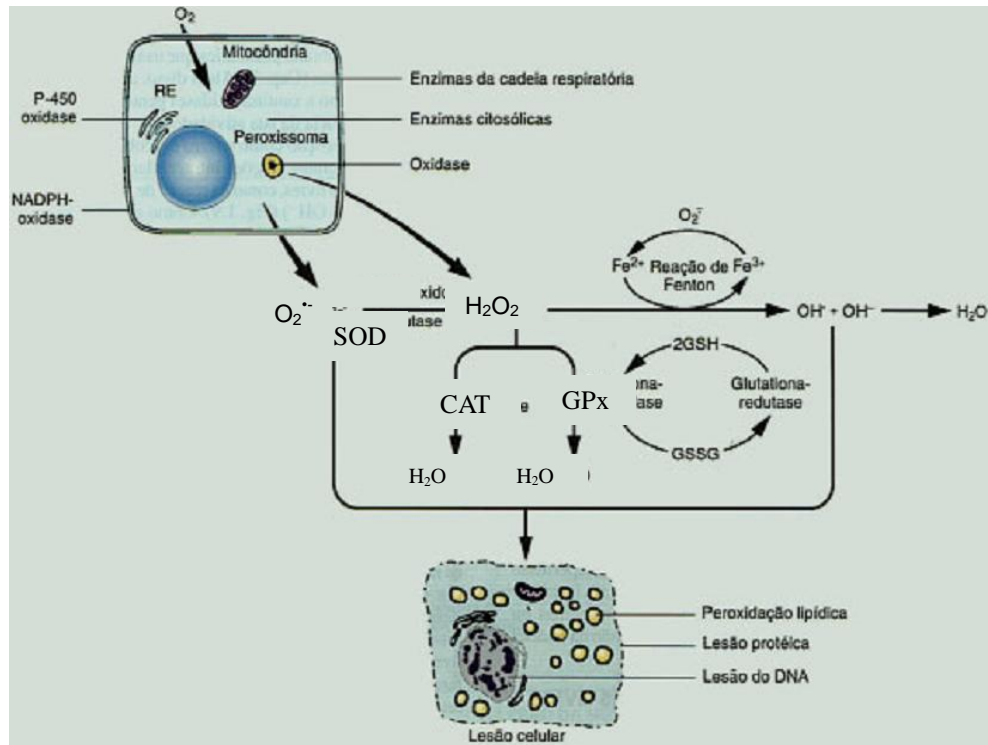
EROs, assim como as derivadas de outras moléculas são radicais livres. Embora sejam bastante instáveis, não apresentam elétrons desemparelhados em seu orbital, como é o caso do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

Pelo fato de os radicais livres serem altamente reativos e instáveis, sua interação com elementos biológicos como aminoácidos, carboidratos, DNA e lipídios de membrana levam, na maioria dos casos, a lesões irreversíveis nestas estruturas. Um único evento iniciado por um radical livre pode ser propagado e causar danos a múltiplas moléculas (JONES, 2008). Os danos mais graves são aqueles causados ao DNA e RNA. Se a cadeia do DNA é quebrada, pode ser reconectada em outra posição, alterando, assim, a ordem de suas bases. Uma enzima que tenha seus aminoácidos alterados pode perder sua atividade ou, ainda, assumir atividade diferente (BARREIROS et al., 2006).

Na tentativa de minimizar ou até mesmo inibir os efeitos deletérios dessas espécies, o nosso organismo possui um complexo e bastante eficiente sistema de defesa antioxidante. De acordo com HALLIWELL (2000) “Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente sua oxidação”.

Os mecanismos de ação dos antioxidantes são diversos, podendo acontecer de duas principais formas. A primeira, impedindo a produção de espécies reativas de oxigênio, através da remoção dessa molécula presente no meio. A segunda, impedindo a propagação do dano promovido por essas espécies, induzindo um aumento da geração de antioxidantes endógenos, atuando como “scavengers”, removendo essas espécies, entre outros mecanismos. Na maioria das vezes, ocorre uma integração funcional de vários destes componentes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Os antioxidantes produzidos pelo corpo podem agir enzimaticamente, a exemplo da glutathiona peroxidase (GPx), da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) ou de forma não-enzimática, a exemplo da glutathiona reduzida (GSH) (FINKEL, 2000). Os mecanismos de ação dos sistemas antioxidantes podem ser melhor compreendidos através da figura 1.3.



**Ilustração 3 - Ação dos antioxidantes sobre as espécies reativas de oxigênio.**

Retirado e adaptado de EDIBERTO, N.; OLIVEIRA, S. de C. e MORAIS, R. N. Radicais livres: conceito, doenças, estresse oxidativo e antioxidantes. Disponível em [www.centrodeestudos.org.br/pdfs/oxidativo.pdf](http://www.centrodeestudos.org.br/pdfs/oxidativo.pdf). Data de acesso: 29/04/2010.

Em modelos de hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina, Farahmand e colaboradores (2004) acompanharam as mudanças no estresse oxidativo de ratos Wistar tratados com MCT nos períodos de uma, duas e seis semanas. Eles observaram que nas primeiras semanas, em especial na segunda, ocorreu um aumento significativo de enzimas antioxidantes no coração desses animais, acompanhado de uma hipertrofia compensada. Já na sexta semana, observou-se uma diminuição significativa dessas enzimas, juntamente com anormalidades tanto na função sistólica, como na diastólica do ventrículo direito. Esses resultados sugerem, portanto, que o estresse oxidativo pode estar altamente envolvido na patogênese da disfunção ventricular direita em ratos com hipertensão pulmonar, tendo os antioxidantes um grande papel na preservação da função cardíaca.

Percebendo isso, estratégias terapêuticas que promovam uma maior produção de antioxidantes, diminuindo o desbalanço redox, seriam importantes ferramentas adjuvantes no tratamento de pacientes com hipertensão arterial pulmonar. Dentre essas estratégias podem ser citados fármacos, antioxidantes



exógenos e exercício físico. O exercício físico é uma proposta bastante interessante por não ser farmacológica, possuir baixo custo e ser de fácil acesso à população.

A relação do exercício com o estresse oxidativo é largamente descrita na literatura. O aumento do consumo de oxigênio, assim como a ativação de vias metabólicas específicas durante ou após o exercício, resulta na formação de radicais livres (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999). Portanto, atividades físicas como corrida, ciclismo e natação podem causar produção de RL tanto em humanos (AGUILÓ et al., 2005) como em modelos experimentais (KAYATEKIN et al., 2002).

Entretanto, ainda que o estresse oxidativo aumente durante o exercício físico, a longo prazo ocorre ativação e aumento na síntese de sistemas antioxidantes, assim como uma diminuição na produção de agentes oxidantes. Isto sugere, portanto, que o treinamento físico pode apresentar como efeito crônico uma diminuição do estresse oxidativo. (KOJDA e HAMBRECHT, 2005). Tais adaptações podem ser benéficas ao indivíduo, mesmo em situações que não envolvam o exercício.

Em relação à insuficiência cardíaca direita, há ainda poucos estudos que mostram os efeitos benéficos do exercício físico. Um único estudo recente, de Mereles et al (2006), observou que o exercício físico, associado a um treinamento respiratório, aumenta a distância no teste de 6 minutos de caminhada em pacientes com hipertensão pulmonar, sugerindo que a prática de exercícios melhoraria a qualidade de vida desses pacientes.

Por outro lado, em um estudo de HANDOKO e colaboradores (2009), em modelo experimental, foi observado que o treinamento físico pode ser benéfico quando uma dose menor de monocrotalina é administrada (considerada como HP estável), mas prejudicial quando se injeta uma alta dose dessa droga (considerada como HP progressiva), aumentando a mortalidade e o remodelamento vascular pulmonar dos ratos portadores da doença.

Em relação ao estresse oxidativo, SOUZA-RABBO e colaboradores (2008) mostraram que o exercício físico parece modular a hipertrofia do ventrículo direito e prolongar a vida de ratos Wistar com hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina (com uma dose de 60mg/kg), estando esses resultados associados a um menor nível de estresse oxidativo. Entretanto, este é o único estudo realizado até o momento associando estresse oxidativo, monocrotalina e treinamento físico.

A partir desses estudos, percebe-se que os dados presentes na literatura ainda são bastante inconclusivos e escassos a respeito dessa tríade. Sabe-se que a dispnéia e a baixa capacidade de realizar atividade física são os primeiros e os principais sinais da hipertensão pulmonar (SCHANNWELL et al., 2007). Tais características são tão importantes nessa doença que, após uma padronização de uma classificação funcional para pacientes com insuficiência cardíaca desenvolvida pela Associação do Coração de Nova Iorque, uma classificação funcional foi desenvolvida para permitir comparações dos pacientes em relação à severidade clínica com o progresso da hipertensão pulmonar (LIBBY et al., 2007).

**Tabela 2 - Classificação funcional da hipertensão pulmonar**

Classe I - Pacientes com hipertensão pulmonar, mas sem nenhuma limitação de atividade física. Atividade física diária não causa dispnéia ou fadiga indevida, dor no peito ou síncope.
Classe II - Pacientes com hipertensão pulmonar, resultando em limitação leve de atividade física. Sentem-se confortáveis em repouso. Atividade física diária causa dispnéia ou fadiga indevida, dor no peito ou síncope.
Classe III - Pacientes com hipertensão pulmonar resultando em limitação da atividade física. Eles são confortáveis em repouso. Menos que atividades diárias causam dispnéia ou fadiga indevida, dor torácica ou síncope.
Classe IV - Pacientes com hipertensão pulmonar com incapacidade de realizar qualquer atividade física sem que haja sintomas. Esses pacientes manifestam sinais de insuficiência cardíaca direita. Dispnéia e /ou fadiga podem estar presentes mesmo em repouso. O desconforto é aumentado por qualquer atividade física.

**Adaptado de Rich S. Executive summary from the World Symposium on Primary Pulmonary Hypertension, Evian, France, September 6-10, 1998, co-sponsored by The World Health Organization.**

Apesar de demonstrada a relevância da presença de uma baixa capacidade física na população que apresenta essa doença, não existe até o presente momento pesquisas que avaliem o estresse oxidativo na musculatura esquelética tanto em humanos como em modelos experimentais de hipertensão pulmonar.

Percebendo isso, este estudo foi criado com o objetivo de analisar o efeito que um treinamento físico aeróbio provoca sobre o estresse oxidativo do músculo gastrocnêmio (fortemente recrutado em atividades como corrida) de ratos Wistar com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina.

## **2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE**

### **2.1 Problema de Pesquisa**

Qual o efeito de um treinamento físico aeróbio sobre o estresse oxidativo no músculo gastrocnêmio em ratos Wistar com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina?

### **2.2 Hipótese**

Baseado nos temas que foram abordados na revisão de literatura, percebendo que a hipertensão está relacionada positivamente com o estresse oxidativo, este estudo sugere como hipótese que por promover, a longo prazo, adaptações do sistema antioxidante celular, o treinamento físico aeróbio diminui o estresse oxidativo do músculo gastrocnêmio, em ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Analisar o efeito que um treinamento físico aeróbio provoca sobre o estresse oxidativo do músculo gastrocnêmio de ratos Wistar com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Quantificar o grau de hipertrofia do ventrículo direito e cardíaca;
- Avaliar o perfil hemodinâmico, através das medidas de pressão ventricular sistólica e diastólica final do ventrículo direito;
- Analisar, no músculo gastrocnêmio, a lipoperoxidação, através das técnicas de quimiluminescência (QL).
- Quantificar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), no músculo gastrocnêmio.
- Determinar a quantidade de peróxido de hidrogênio no músculo gastrocnêmio.
- Verificar a relação entre a glutatona reduzida e a glutatona oxidada no músculo gastrocnêmio.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar pesando aproximadamente 120 gramas advindos do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram mantidos em caixas plásticas com medidas de 270 x 260 x 310 mm, contendo quatro animais por caixa. Todos os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (21°C) e ciclo “claro-escuro” de 12 horas e umidade relativa de 70%. Água e ração comercial foram oferecidas “ad libitum”. A evolução do peso foi aferida semanalmente.

### 4.2 Cálculo Amostral

O tamanho da amostra foi calculado *a priori*. Para o cálculo da amostra foi utilizado o programa SigmaPlot 11.0, considerando-se um  $\alpha=0,05$  e poder estatístico de 95% ( $\beta=0,10$ ), constando assim uma amostra 34 ratos . A diferença mínima detectada entre as médias foi de 10%, considerando um desvio padrão de 5%. De acordo com resultados encontrados na literatura, entre os animais tratados com MCT, a taxa de mortalidade para o período de estudo, 4 semanas, gira em torno de 25%, então, nos grupos MCT sedentário e MCT treinado, ao tamanho amostral calculado foram acrescentados 3 animais (HENKENS et al, 2007; OKADA et al, 2008; HESSEL et al, 2006; RABBO et al, 2008).

### 4.3 Grupos Experimentais

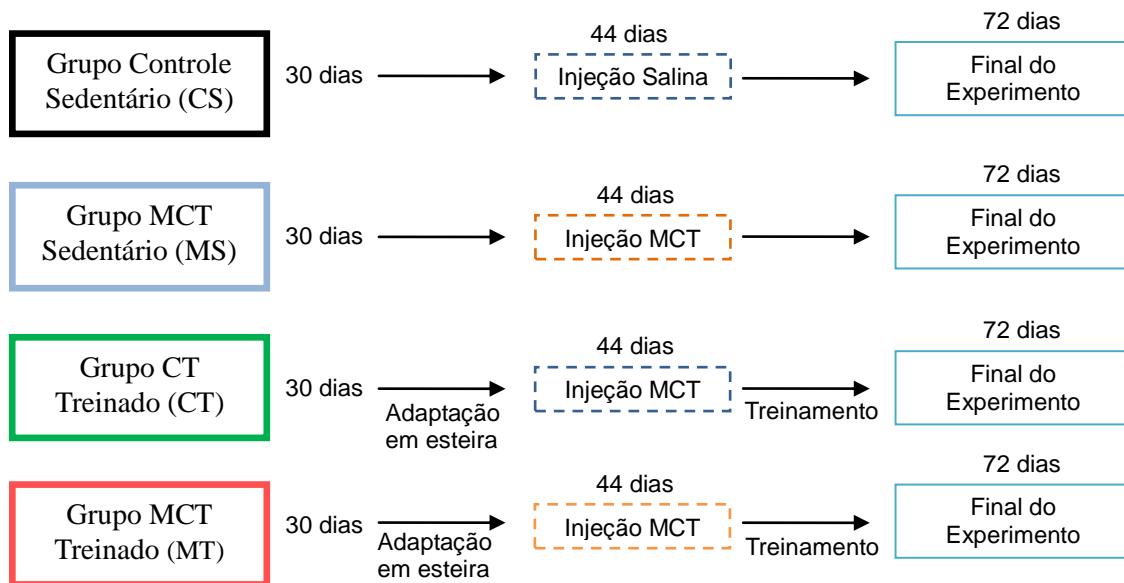
Para o estudo, foram formados quatro grupos experimentais da seguinte maneira:

1. Grupo Controle Sedentário (CS) -  $n= 8$  - sem administração de Monocrotalina e sem execução treinamento físico.
2. Grupo Controle Treinado (CT) -  $n= 8$  - sem administração de Monocrotalina, mas submetido ao protocolo de treinamento físico.

3. Grupo Monocrotalina Sedentário (MS) -  $n= 9$  - com administração de Monocrotalina, mas sem execução de treinamento físico.
4. Grupo Monocrotalina Treinado (MT) -  $n= 9$  - com administração de Monocrotalina e submetido ao protocolo de treinamento físico.

#### **4.4 Protocolo Experimental**

A partir do trigésimo dia após o nascimento, os animais dos grupos controle treinado e monocrotalina treinado realizaram adaptação ao exercício físico que consistiu em duas semanas de corrida em esteira rolante adaptada. Após o término desse período, foi induzida a hipertensão arterial pulmonar, com insuficiência cardíaca direita, por injeção de monocrotalina nos grupos MS e MT. Após a administração da monocrotalina, o protocolo de treinamento iniciou e foi mantido por quatro semanas. Para a indução de hipertensão arterial pulmonar, com 45 dias de vida e peso corporal de aproximadamente 180 gramas, os ratos dos grupos MT e MS receberam uma única dose intraperitoneal de 60 mg/kg de monocrotalina (Sigma, crotaline - C240, USA). A diluição da MCT foi feita em 0,5 mL de HCl 0,1 N. Após a diluição, o pH foi ajustado até que atingisse o valor 7,4 com a adição de NaOH 1N. Para completar o volume final injetado foi utilizado soro fisiológico (SINGAL et al, 2000). Essa preparação corresponde para um rato de 200g, por exemplo, uma injeção contendo 200 $\mu$ L de solução, não alterando, portanto, sua volemia. Os ratos dos grupos controle receberam dose única, contendo apenas solução salina, na mesma concentração dos grupos experimentais para passarem pela mesma situação de estresse (Tabela 3). Além disso, todos os animais permaneceram no mesmo ambiente durante o treinamento para passarem pelo mesmo processo de estresse ambiental.

**Tabela 3 - Protocolo Experimental**

#### 4.5 Protocolo de Treinamento

O protocolo de treinamento foi constituído de sessões de corrida em esteira adaptada (modelo TK 01, IMBRAMED) segundo protocolo pré-estabelecido para ratos Wistar com cardiopatia (RODRIGUES et al, 2007), sendo a frequência de cinco vezes por semana (segunda à sexta), durante o período de quatro semanas após a injeção da monocrotalina. Baseando-se nesse protocolo, foram realizados dois testes de velocidade máxima, um após o período de adaptação, logo antes do período de treinamento, e outro na segunda semana de treinamento. Nesse protocolo a velocidade é aumentada em 3m/min a cada três minutos até a exaustão. É considerada a velocidade máxima o estágio completado pelo animal antes da exaustão. O cálculo para a porcentagem da velocidade máxima é realizado com uma média aritmética de todas as velocidades máximas dentro de cada grupo experimental. A partir dos resultados foi determinada a velocidade média em que os grupos de animais deveriam correr para atingir 60% do  $VO_{2máx}$ , intensidade essa considerada como sendo predominantemente aeróbia. Os animais foram anestesiados e sacrificados, individualmente, por deslocamento cervical após análise hemodinâmica e vinte quatro horas após a última sessão de treinamento em esteira.



## **4.6 Considerações éticas na vivisseção dos animais**

O estudo desenvolvido seguiu a Lei 6638, de 08 de maio de 1979, que estabelece normas para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de animais, dos Princípios Éticos na Experimentação Animal, formulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, assim como aquelas contidas nos Princípios Internacionais Orientadores para a pesquisa Biomédica envolvendo Animais provenientes do Council for International Organizations of Medical Science (CIOMS) (GOLDIM, 1997). O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (18927).

## **4.7 Avaliação da Doença**

### **4.7.1 Avaliação Hemodinâmica**

Os animais foram anestesiados com ketamina (90mg/kg) e xilasina (10mg/kg) e tiveram a veia jugular exposta. Uma cânula (cateter de polietileno PE-50) foi implantada e introduzida até o átrio e ventrículo direito. A pressão sistólica ventricular direita e a pressão diastólica final ventricular direita foram monitoradas usando um transdutor de pressão (Strain-Gauge – Narco Biosystem Miniature Pulse Transducer RP-155; Houston, Texas – EUA) ligado a um amplificador de sinais (Pressure Amplifier HP 8805C). Os sinais analógicos de pressão arterial foram digitalizados (CODAS-Data Acquisition System, PC) com frequência de amostragem de 2 KHz.

### **4.7.2 Hipertrofia cardíaca**

O índice de hipertrofia cardíaca (IHC) oferece dados quanto ao aumento de massa muscular do coração. Esse dado pode ser calculado de diversas formas. No presente estudo esse índice foi feito pela relação entre o peso, em miligramas, do tecido cardíaco e o peso corporal do animal, em gramas. Dois índices de hipertrofia do ventrículo direito também foram realizados. No primeiro, a divisão é feita entre o peso do ventrículo direito pelo peso corporal, indicando a hipertrofia dessa câmara. O segundo índice relaciona o peso do tecido cardíaco, em miligramas, pelo comprimento da tíbia, em milímetros.

## **4.8 Análise do Estresse Oxidativo**

Para a realização das análises de estresse oxidativo, o músculo gastrocnêmio foi homogeneizado durante 40 segundos em Ultra-Turrax. Para cada grama de músculo, foram acrescentados 5 mL de KCl. Foram acrescentados 10 µL de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), 100mmol/L, para cada 1 mL do homogeneizado e 15 µL de solução Triton 10% para cada 1 grama de músculo. Após, o homogeneizado foi centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi, então, retirado e congelado em freezer -80°C para as posteriores dosagens (LLESUY et al., 1985).

### **4.8.1 Relação GSH/GSSG**

Para determinar a glutathiona total, o homogeneizado dos tecidos precisou ser desproteinizado com ácido perclórico 2 mol/L e centrifugado por 10 minutos a 1000g. O sobrenadante foi neutralizado com hidróxido de potássio 2 mol/L. O meio de reação continha tampão fosfato 100 mmol/L (pH 7,2), ácido nicotinamida dinucleotídeo fosfato (NADPH) 2 mmol/L, glutathiona redutase 0,2 U/mL, ácido ditionitrobenzóico 70 µmol/L. Na determinação da glutathiona reduzida, o sobrenadante neutralizado reagiu com ácido ditionitrobenzóico 70 µmol/L e foi lido no espectrofotômetro a 420nm (AKERBOON e SIES, 1981).

### **4.8.2 Quimiluminescência**

O método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética ao homogeneizado de tecido, avaliando-se a capacidade de resposta produzida pela amostra. A realização deste tipo de teste consiste no fato de que os hidroperóxidos são espécies químicas bastante instáveis, reagindo com lipídios por um mecanismo radicalar que gera produtos que emitem luz pela amostra em estudo. A quimiluminescência foi medida em contador beta (LKB Rack Liquid Scintillation Spectrometer). O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistia em 3,5mL de uma solução reguladora de KCl 140 mmol/L, fosfatos 20 mmol/L, (pH 7,4), na

qual foi adicionado 0,5 mL de amostra. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps), por miligrama de proteína segundo Gonzalez-Flecha et. al (1991).

#### **4.8.3 Atividade da Superóxido Dismutase**

A superóxido dismutase catalisa a reação de dois ânions superóxido, com a consequente formação de peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a catalase e a glutathione peroxidase. A técnica utilizada neste trabalho para determinação da SOD foi baseada na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção.

A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado (MARKLUND, 1985).

Para tanto, primeiramente foi efetuada uma curva padrão usando as concentrações de 0; 0,25; 0,5 e 1 unidade de SOD, através da qual foi obtida a equação da reta para realização dos cálculos. Foram adicionados solução tampão (Tris-base 50 mmol/L e EDTA 1 mmol/L, em pH 8,2), 4 µL de solução de catalase (30µmol/L), volumes adequados das soluções de SOD e 8 µL de pirogalol 24 mmol/L (em ácido clorídrico a 10 mM), obtendo-se as concentrações desejadas.

No meio de reação, foram utilizados 15 µL da amostra dos músculos previamente preparada, tampão Tris-base, 8 µL de pirogalol (24 mmol/L) e 4 µL de catalase (30µmol/L). A variação na absorbância foi acompanhada a 420 nm durante 2 minutos e os resultados expressos em U/mg de proteína.

#### 4.8.4 Atividade da Catalase

A taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade da CAT, e obedece a uma cinética de pseudoprimeira ordem com relação a este. Desta forma, o consumo de  $H_2O_2$  pode ser utilizado como uma medida de atividade da enzima CAT.

O ensaio consiste em medir a diminuição da absorbância no comprimento de onda de 240 nm. Para a realização das medidas foi usada uma solução tampão de fosfatos de sódio a 50 mM em pH 7,4 e peróxido de hidrogênio 0,3 mol/L. Foram adicionados 955  $\mu$ L deste tampão e 10  $\mu$ L de amostra na cubeta do espectrofotômetro, sendo esta mistura descontada contra um branco de tampão fosfato. A seguir foram adicionados 35  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio e avaliou-se a diminuição da absorbância durante dois minutos no comprimento de onda selecionado. Os resultados foram expressos em pmoles por mg de proteína (BOVERIS e CHANCE, 1973).

#### 4.8.5 Medida de peróxido de hidrogênio

O método está baseado na oxidação do vermelho de fenol pelo peróxido de hidrogênio mediado pela peroxidase de rabanete, resultando num produto que absorve em 610 nm. O tecido foi incubado por 30 minutos em tampão fosfato 10 mol/L (NaCl 140 mol/L e dextrose 5 mol/L). Após centrifugação por 30 segundos a 1000 X G em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24), o sobrenadante foi coletado e adicionado na solução tampão de vermelho de fenol 0,28 mol/L e peroxidase de rabanete 8,5 U/mL. Após o intervalo de 5 minutos, foi adicionado NaOH 1N e efetuada a leitura a 610 nm. Os resultados foram expressos em nmoles de  $H_2O_2$  por mg de proteína (PICK & KEISARI, 1980).

#### 4.8.6 Quantificação de Proteína

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores (1951), que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1mg/mL. Reagentes utilizados: Reativo de Follin Ciocalteau, diluído em água destilada na proporção 1:3, e Reativo C, que é composto por 50mL do

reativo A, 0,5mL do reativo B1 e 0,5mL do reativo B2, onde os reativos A, B1 e B2 são, respectivamente:  $\text{NaHCO}_3$  (bicarbonato de sódio) 2% (p/v) em NaOH (hidróxido de sódio) 0,1N;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (sulfato de cobre) 1% (p/v);  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (tartarato de sódio e potássio) 2% (p/v). A medida foi efetuada em espectrofotômetro a 625 nm e os resultados expressos em mg/mL.

#### **4.9 Análise Estatística**

Com base nos resultados obtidos, foram calculadas as médias e os desvios padrões da média para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados.

Foi utilizado o teste de Bartlett, para avaliar o comportamento paramétrico ou não-paramétrico dos dados. A avaliação da normalidade (distribuição Gaussiana) foi realizada através do método de Kolmogorov e Smirnov. Uma vez que os dados tenham passado pelos dois testes, a comparação entre dados paramétricos foi feita através da análise de variância de duas vias (ANOVA), com o teste complementar de Holm-Sidak. Para os dados não-paramétricos o teste complementar foi feito por Dunn. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou  $p < 0,05$ .

#### **4.10 Grau de Severidade dos procedimentos**

1 - Avaliação hemodinâmica e sacrifício dos animais: sem recuperação.

Durante a avaliação hemodinâmica os animais estarão anestesiados e, após o procedimento, serão sacrificados ainda sob o efeito dos medicamentos.

2 - Aplicação de monocrotalina e de anestésico: leve.

3 - Progressão da dor: moderado.

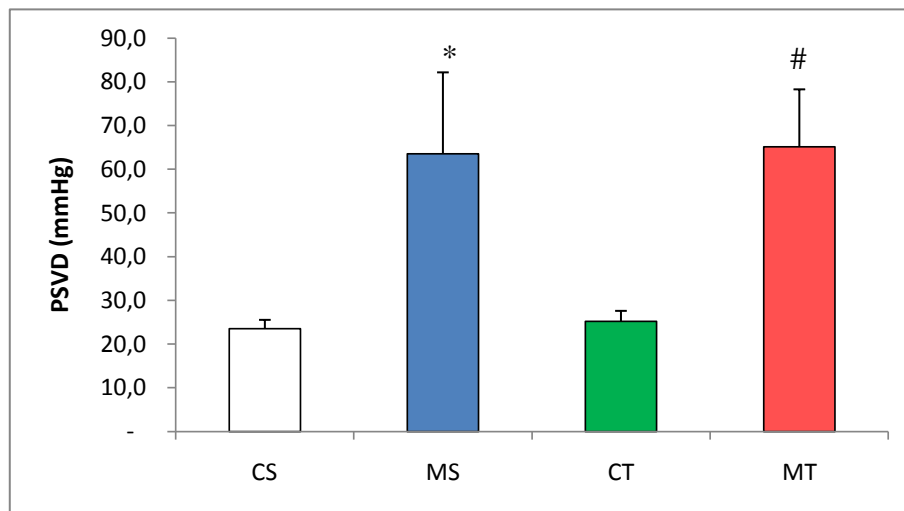
Embora a hipertensão arterial pulmonar seja uma doença progressiva associada com dor e desconforto, os animais serão sacrificados entre a terceira e a quarta semanas após a aplicação da droga, não sendo esse tempo suficiente para levar à morte dos animais.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação Hemodinâmica

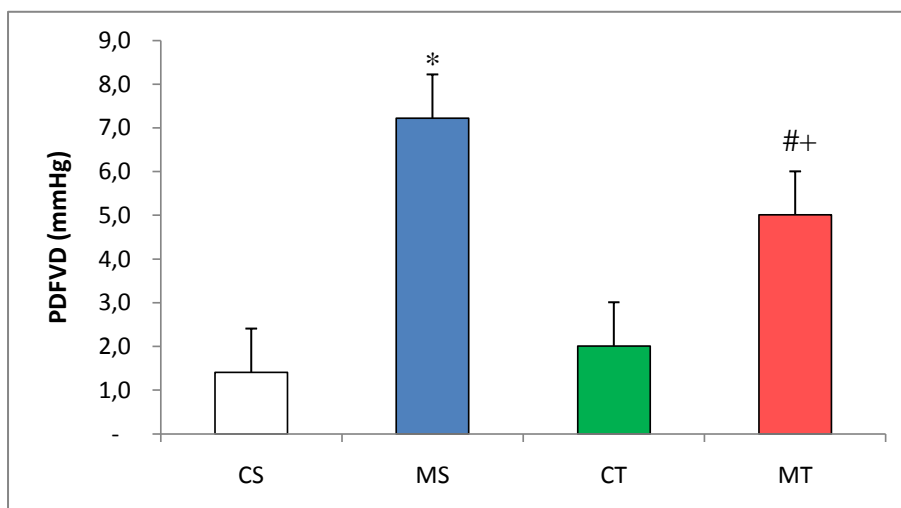
A avaliação cardíaca foi mensurada para verificar se a doença foi estabelecida a partir de duas de suas características: pressão ventricular elevada e hipertrofia cardíaca direita.

#### 5.1.1 Registro de pressão ventricular



**Figura 1. Pressão ventricular sistólica direita (PSVD), em mmHg. Resultados expressos em média +- DP, com 5 animais por grupos. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. \* significativo versus CS; # significativo versus CT. P<0,001.**

Como observado, a PSVD aumentou significativamente em ambos os grupos tratados com monocrotalina, em relação aos seus controles (169% e 158%, respectivamente). Já a PDFVD, demonstrada a seguir, embora também tenha apresentado o mesmo padrão de aumento (412% e 149%, respectivamente), houve uma diminuição significativa da pressão no grupo monocrotalina treinado quando comparado ao monocrotalina sedentário.



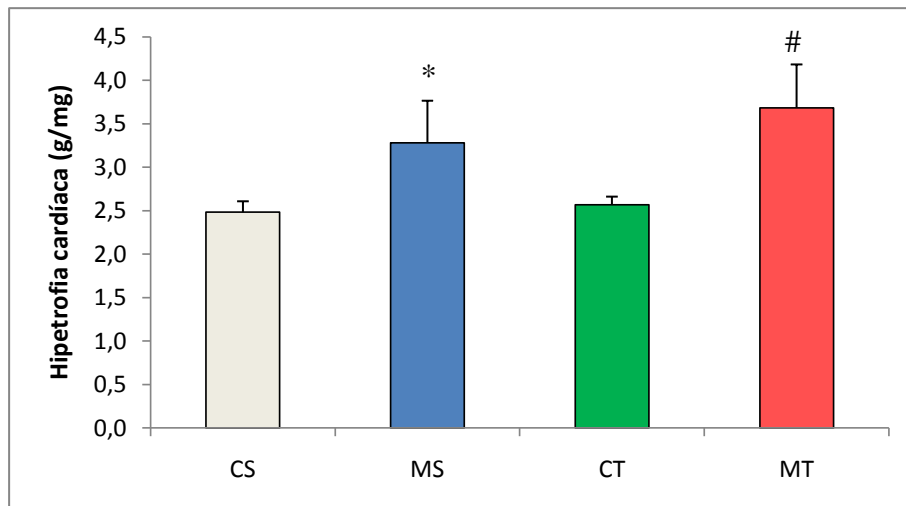
**Figura 2. Pressão ventricular diastólica final direita (PDFVD), em mmHg. Resultados expressos em média +- DP, com 5 animais por grupos. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. \* significativo versus CS; # significativo versus CT; + significativo versus MS. + P<0,05; \* # P<0,001.**

### 5.1.2 Hipertrofia Cardíaca e do Ventrículo Direito

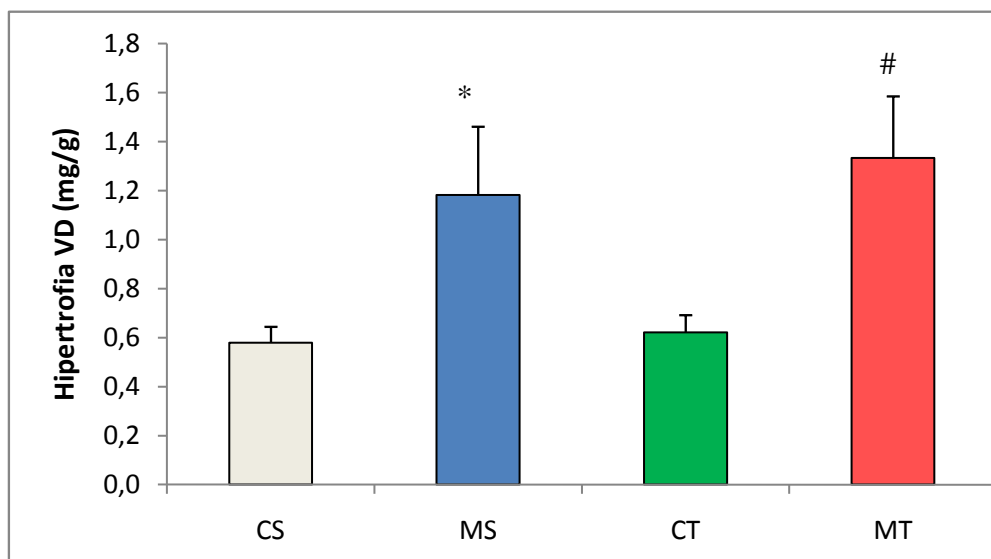
O índice de hipertrofia cardíaca relacionou o peso total do coração pelo peso do animal (em mg/g peso corporal); O segundo índice – de hipertrofia do ventrículo direito - foi feito pela razão entre o peso do ventrículo direito (VD) pelo peso do animal; o último – também apenas do VD -, pela razão entre o ventrículo direito – em miligramas – e o comprimento da tíbia, em milímetros.

Os três índices apresentaram o mesmo padrão de resultado: um aumento significativo da hipertrofia cardíaca nos grupos monocrotalina treinado e monocrotalina sedentário, quando comparados, respectivamente, aos grupos controle sedentário e controle treinado.

No primeiro índice – peso do coração pela massa corporal – esse aumento, foi de, respectivamente, 32 e 43% nos grupos MS e MT. Quando relacionado apenas o ventrículo direito pelo peso do animal – segundo índice – os aumentos encontrados foram de 103% e 114%, respectivamente. Por fim, no último índice – peso do ventrículo direito pelo comprimento da tíbia, os aumentos foram, respectivamente, de 78 e 57%.

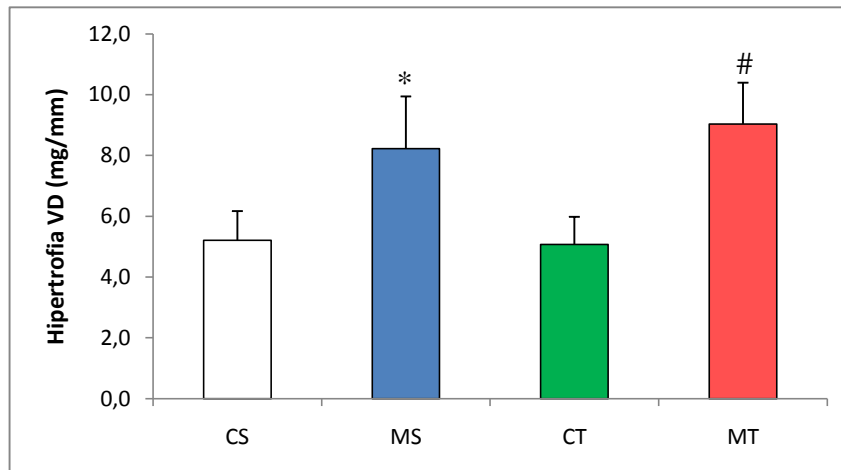


**Figura 3. Índice de hipertrofia cardíaca (peso do coração/peso corporal). Resultados expressos em média +- DP, com 5 animais por grupos. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. \* significativo versus CS; # significativo versus CT; P<0,05.**



**Figura 4. Índice de hipertrofia do VD (peso do ventrículo direito/peso corporal). Resultados expressos em média +- DP, com 5 animais por grupos. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. \* significativo versus CS; # significativo versus CT; P<0,05.**





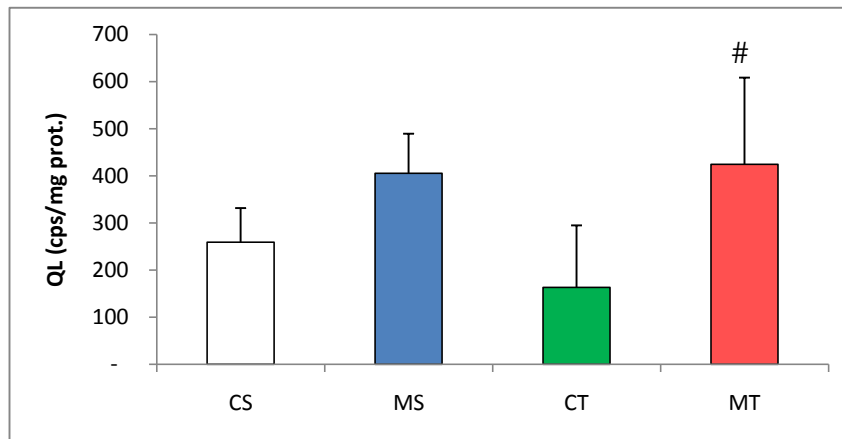
**Figura 5. Índice de hipertrofia do VD (peso do ventrículo direito/ comprimento da tíbia). Resultados expresos em média +- DP, com 5 animais por grupos. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. \* significativo versus CS; # significativo versus CT; P<0,05.**

## 5.2 Análise de Estresse Oxidativo.

Para análise do dano oxidativo, foram realizadas análises de lipoperoxidação por quimiluminescência e concentração do peróxido de hidrogênio. Posteriormente, para verificar a ação do sistema antioxidante, foram analisadas as atividades das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), bem como a relação da glutathiona reduzida pela oxidada.

### 5.2.1 Lipoperoxidação por Quimiluminescência

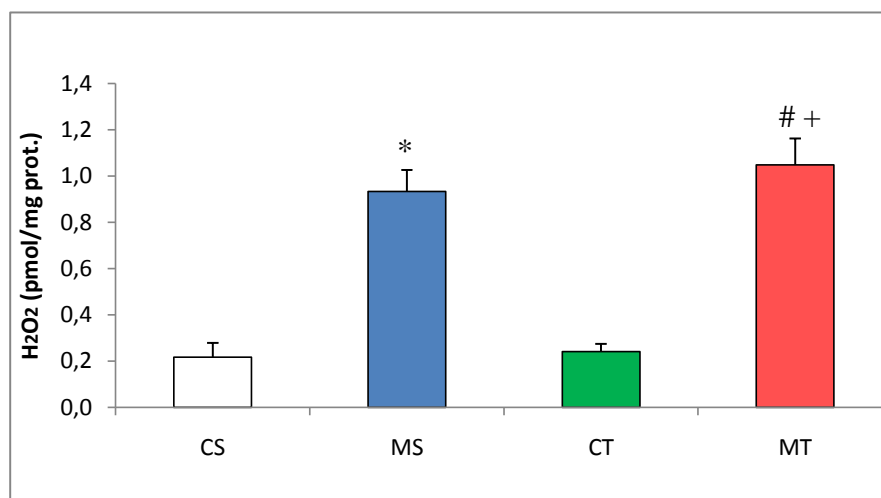
Ao avaliar a lipoperoxidação, percebeu-se um aumento do dano lipídico de 160% nos animais do grupo monocrotalina treinado em relação ao seu controle (CT). Embora não tenha sido observada uma diferença significativa no grupo MS em relação ao CS, observou-se uma tendência ( $p=0,084$ ) de maior dano no primeiro quando comparado ao segundo (56%).



**Figura 6. Quimiluminescência (cps/mg prot.) em homogeneizado de gastrocnêmio. Resultados expressos em média +- DP, com 5 animais por grupos. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. # significativo versus controle treinado (CT). P<0,05**

### 5.2.2 Concentração de Peróxido de Hidrogênio

Em relação às concentrações de peróxido de hidrogênio, os ratos com hipertensão arterial pulmonar mostraram níveis superiores dessa espécie ativa de oxigênio (330% e 334%, respectivamente) quando comparados aos seus respectivos controles. O treinamento físico, além disso, aumentou, nos animais hipertensos, esse dano em 12% quando comparado aos que não realizaram exercício aeróbio.

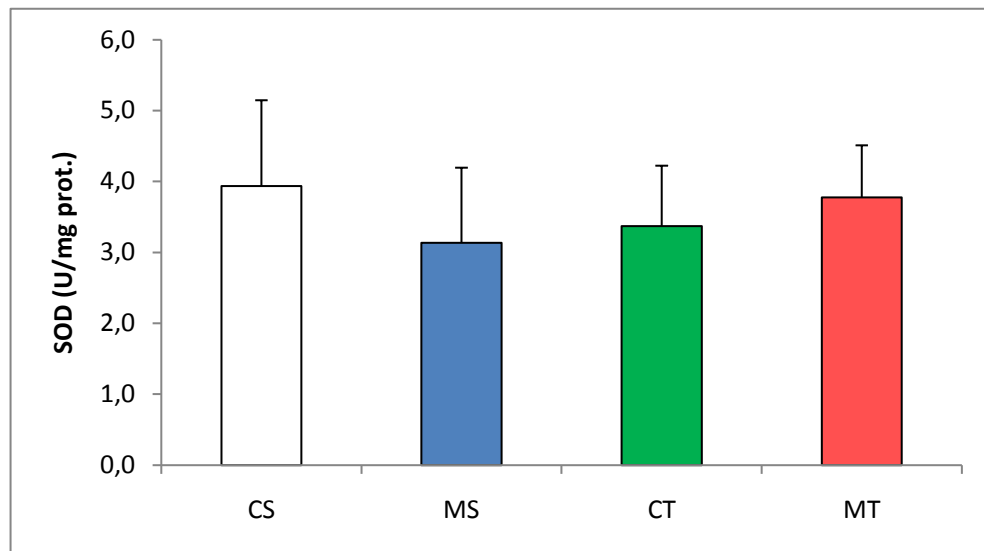


**Figura 7. Concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pmol/mg prot.) em homogeneizado de gastrocnêmio. Resultados expressos em média +- DP, com 5 animais por grupos. CS = controle**

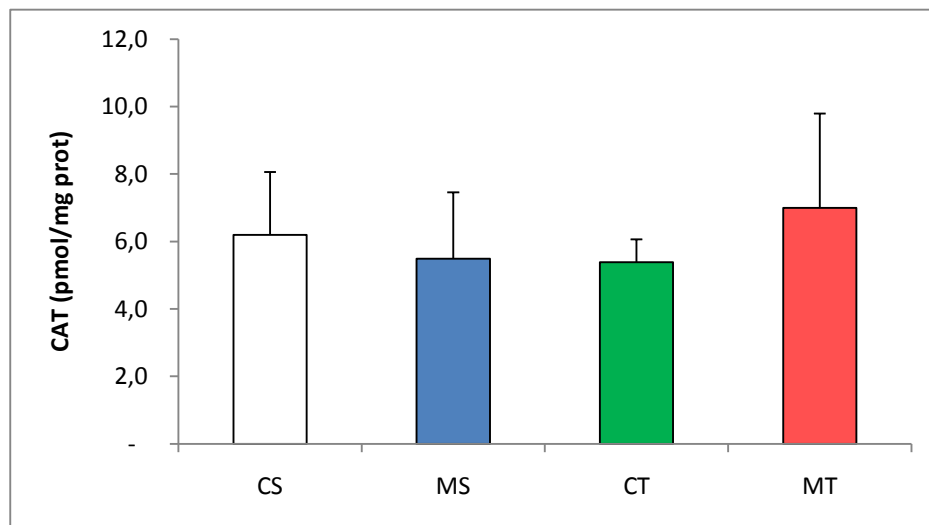
sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. \* significativo *versus* CS; # significativo *versus* CT; + significativo *versus* MS.  $P < 0,05$

### 5.2.3 Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)

Tanto a atividade da enzima superóxido dismutase, como a atividade da enzima catalase, não apresentaram quaisquer diferenças significativas entre os grupos analisados.



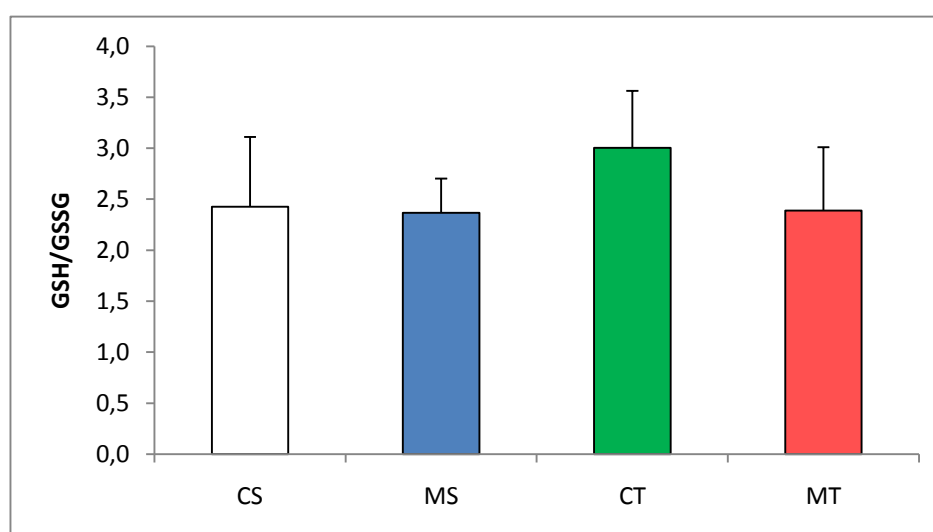
**Figura 8. Atividade da superóxido dismutase (SOD) em unidades de por miligrama de proteína em homogeneizado de músculo gastrocnêmio. Resultados expressos em média +- DP, com 5 animais por grupos. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado.**



**Figura 9. Atividade da catalase (CAT) em picomol/mg proteína em homogeneizado de músculo gastrocnêmio. Resultados expressos em média +- DVP, com 5 animais por grupos. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado.**

#### 5.2.4 Relação da glutathiona reduzida pela glutathiona oxidada (GSH/GSSG)

Ao relacionar a glutathiona reduzida pela glutathiona oxidada, como um marcador antioxidante não enzimático, não percebemos diferenças significativas entre os grupos estudados.



**Figura 10. Resultados expressos em média +- DVP, com 5 animais por grupos. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado.**

## 6 DISCUSSÃO

A hipertensão arterial pulmonar é caracterizada por um remodelamento das artérias pulmonares com proliferação endotelial, hipertrofia da musculatura lisa e expansão da camada adventícia. Aumento na pressão arterial pulmonar, hipertrofia ventricular direita e eventual *Cor pulmonale* são manifestações de uma complexa patofisiologia que compõe essa doença (RAMOS et al., 2008).

No presente estudo, os dados preliminares demonstraram um aumento da pressão ventricular direita nos animais que receberam monocrotalina em relação aos seus respectivos controles. Esse resultado, associado aos índices de hipertrofia cardíaca, também elevados nos mesmos grupos que apresentaram tais modificações, indicam que a hipertensão arterial pulmonar foi bem estabelecida nesse modelo, demonstrando, dessa forma, que o aumento da massa cardíaca é necessária para vencer a resistência imposta pelo estreitamento dos vasos pulmonares.

Embora os grupos tratados com monocrotalina tenham apresentado um aumento no pico de pressão ventricular sistólica e diastólica direita, quando comparados aos seus controles, o grupo MT diminuiu significativamente a pressão diastólica final em relação ao grupo MS, indicando, assim, uma possível consequência benéfica do treinamento físico aeróbio. Esses resultados são bastante semelhantes aos encontrados em estudos anteriores de nosso laboratório: Souza-Rabbo (2005) avaliou marcadores de estresse oxidativo e a função cardíaca de ratos com *Cor pulmonale* induzida por monocrotalina em diferentes períodos e encontrou um aumento significativo da pressão ventricular sistólica e diastólica nos animais que continham a doença, nos períodos de 3 e 4 semanas. Além disso, também indo ao encontro do presente estudo, encontrou uma diminuição da pressão diastólica final direita no grupo monocrotalina treinado, quando comparado ao monocrotalina sedentário.

A hipertensão arterial pulmonar aumenta a resistência vascular periférica e leva à insuficiência cardíaca direita (McLURE e PEACOCK, 2007). As pressões elevadas refletem a tentativa de combater essa maior resistência imposta pela artéria pulmonar nos ratos com a doença. Em relação à pressão diastólica, os animais do grupo monocrotalina treinado apresentaram uma diminuição de tais valores quando comparados aos seus controles. A pressão diastólica refere-se à

pressão imposta pelo sangue ao final de uma diástole. Assim, o resultado encontrado indica que os animais do grupo monocrotalina treinado conseguem diminuir o volume residual ao final da diástole, elevado no grupo monocrotalina sedentário, indicando um benefício decorrente do treinamento físico.

Em relação à hipertrofia cardíaca, todos os índices avaliados mostraram que, no período de quatro semanas, ela ocorre nos animais com HAP tanto sedentários como treinados. A hipertrofia do ventrículo direito é uma característica já bem descrita da HAP (KATZ et al., 1993). Já em 1959, Padmavati e Pathak demonstraram em um estudo de caso com 127 pacientes de uma zona rural da Índia, portadores de *Cor pulmonale*, um aumento, em média, de 67% do tamanho do ventrículo direito. Resultados semelhantes também já foram encontrados em nosso laboratório (SOUZA-RABBO et al., 2008; LUDKE et al., 2010).

No presente estudo, durante o período de quatro semanas, com o protocolo realizado, o exercício físico não foi capaz de alterar significativamente o grau de hipertrofia. O remodelamento cardíaco está intimamente relacionado com as espécies ativas de oxigênio (GIORDANO et al., 2005). O exato mecanismo que leva a tais adaptações ainda não é bem entendido. Concentrações baixas de espécies ativas de oxigênio poderiam levar ao desenvolvimento de uma hipertrofia fisiológica, sendo essa uma consequência bastante observada após um programa de exercício físico. Farahmand e colaboradores (2004) sugerem, entretanto, que na HAP, um aumento no dano oxidativo acentuado, não acompanhado de uma adequação do sistema antioxidante, pode exercer um papel importante na falha do ventrículo direito, levando a uma hipertrofia patológica.

No presente estudo, o índice de hipertrofia cardíaco foi realizado com o único objetivo de verificar as modificações na massa desse tecido, sendo o crescimento do VD uma característica presente na doença, validando, de forma indireta, o nosso modelo. Em futuros estudos, para observar a influência do exercício de forma mais específica sobre o coração, vias de sinalização de crescimento e de apoptose celular, bem como o tamanho de cardiomiócitos, seriam estratégias interessantes a serem utilizadas na investigação desse processo.

Os grupos controle sedentário e controle treinado não apresentaram diferenças nos índices hipertróficos. Sabe-se que o exercício físico de baixa intensidade é capaz de promover, a longo prazo, hipertrofia cardíaca fisiológica (SHAPIRO, 1984). Talvez o período de treinamento (quatro semanas) da presente

pesquisa não tenha sido suficiente para gerar esse crescimento nos grupos que foram treinados. De fato, a maioria dos estudos demonstram hipertrofia cardíaca em períodos mais longos. ANVERSA e colaboradores (1983) demonstraram um aumento de 17% no índice de hipertrofia cardíaca em ratos treinados após um período de sete semanas quando comparados aos animais sedentários. GARCIARENA e colaboradores (2009) perceberam resultados semelhantes ao submeter um protocolo de treinamento físico em ratos espontaneamente hipertensos durante um período de sessenta dias.

Percebendo esses fatos, os altos índices de hipertrofia cardíaca no presente estudo parecem ter sido devidos, exclusivamente, à doença. Um fator limitante do nosso estudo manifesta-se no fato de que os animais com hipertensão arterial pulmonar apresentam um índice de mortalidade muito alto, principalmente a partir da quarta semana após a injeção de monocrotalina, não permitindo um período de treinamento prolongado após a injeção. Uma possível estratégia para futuras investigações seria iniciar o treinamento físico algumas semanas antes de administrar a droga, sendo possível verificar a interferência do exercício físico sobre a função e estrutura cardíaca e de que forma a doença interfere sobre esses parâmetros.

Outro fator limitante é a ausência, na literatura, de protocolos específicos para a prescrição de treinamento físico, tanto em animais como em humanos, na população estudada. Como não há em nosso laboratório equipamento que avalie consumo direto de oxigênio, a prescrição foi baseada em um estudo de RODRIGUES e colaboradores (2007), que relacionaram o consumo direto de oxigênio com um teste de velocidade máxima em ratos diabéticos com insuficiência cardíaca. Por não se tratar da mesma população, talvez o treinamento não tenha sido o mais adequado e futuras investigações seriam relevantes neste contexto.

Em relação ao estresse oxidativo na musculatura esquelética, o principal objetivo desse trabalho, percebeu-se um aumento na produção de espécies ativas de oxigênio, pela concentração de peróxido de hidrogênio, nos animais com HAP. Esse aumento foi ainda maior no grupo MT em relação ao MS, podendo ter contribuído para a presença de dano lipídico apenas nesse grupo, ainda que o grupo MS tenha demonstrado uma tendência de aumento em relação ao seu controle.

A literatura apresenta resultados bastante controversos a respeito do exercício físico na hipertensão arterial pulmonar. Enquanto SOUZA-RABBO e colaboradores,

em 2008, demonstraram uma maior sobrevida nos animais exercitados com Cor pulmonale induzida por monocrotalina, numa dose de 60mg/kg, HANDOKO e colaboradores, em 2009, observaram, para uma mesma dose, uma alta taxa de mortalidade nos animais que realizaram treinamento físico em comparação aos que permaneceram sedentários. Ainda neste último estudo, uma comparação entre duas concentrações de monocrotalina foi realizada. Os animais treinados que receberam uma dose de 30mg/kg, considerada pelos autores como uma hipertensão pulmonar estável, apresentaram uma sobrevida maior em relação aos animais sedentários. Já a dose de 60mg/kg, a mesma utilizada no presente estudo, considerada por eles como uma hipertensão arterial progressiva, acentuou as características da doença, acarretando em uma mortalidade antecipada.

De fato, o exercício não parece ter se mostrado benéfico, no músculo gastrocnêmio, no presente estudo. Além de promover um aumento no dano lipídico e aumentar a produção de peróxido de hidrogênio nos animais doentes, não foi capaz de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, como a catalase e a superóxido dismutase. COUILLARD e colaboradores (2003) analisaram o estresse oxidativo induzido pelo exercício na musculatura do quadríceps de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Em consonância com nossos resultados, perceberam um aumento no dano lipídico comparado aos pacientes sedentários e não encontraram diferenças significativas na atividade da glutathione peroxidase, apesar de os dois grupos com DPOC terem apresentado uma atividade menor comparada aos indivíduos saudáveis.

Curiosamente, o tecido muscular não demonstrou desbalanço redox, visto que a relação GSH/GSSG não apresentou diferenças significativas. Acreditamos, assim, que outros sistemas antioxidantes possam estar atuando, como a GPx, a tiorredoxina, a peroxirredoxina, evitando, assim, a instalação de um quadro de estresse oxidativo.

Como percebido, além de escassa, a literatura é bastante inconclusiva. COUILLARD e colaboradores (2003) sugerem uma possível disfunção muscular esquelética induzida pelo exercício em pacientes com DPOC, doença que predispõe à hipertensão arterial pulmonar. Os mecanismos que levariam a essa disfunção são desconhecidos. O exercício pode ocasionar um aumento do estresse oxidativo pela maior produção de agentes pró-oxidantes ou por uma atividade antioxidante inadequada. A xantina oxidase pode, também, ser uma importante fonte de produção



de oxidantes em pacientes com DPOC durante o exercício. HEUNKS e colaboradores (1999) mostraram que a lipoperoxidação induzida pelo exercício agudo em pacientes com DPOC pode ser prevenida pelo tratamento com alopurinol, um potente inibidor da xantina oxidase.

De forma distinta, HANDOKO e colaboradores, em outro estudo de 2009, mostraram que o exercício pode ser benéfico em pacientes com hipertensão arterial pulmonar idiopática. Para isso, um programa de 12 semanas de exercício físico foi realizado e os autores perceberam um aumento na distância percorrida no teste de seis minutos de caminhada, bem como uma elevação de 13% da força máxima do músculo quadríceps desses pacientes. Esse parece ser o único estudo, até o momento, que avalia a função muscular esquelética em pacientes com HAP, mas não apresenta dados referentes a estresse oxidativo.

Os resultados preliminares do presente estudo indicam que a doença parece promover um aumento no dano oxidativo no músculo gastrocnêmio de animais com HAP induzida por monocrotalina. Este é o primeiro estudo que realiza tal análise numa população que contém essa doença e associa com as possíveis interferências provocadas por um programa de treinamento físico aeróbio. Destarte, os resultados, atualmente, estão limitados pelo reduzido número amostral. Aumentando o número de animais, atualmente correspondendo à metade do estabelecido pelo cálculo amostral, alguns dos resultados podem vir a ser alterados.

## 7 PERSPECTIVAS

Percebendo que os resultados apresentados são parciais, este estudo ainda possui algumas perspectivas, na tentativa de melhor explicar de que forma o estresse oxidativo pode estar se manifestando na musculatura esquelética dos animais com HAP. Como prioridade, pretendemos quantificar a atividade da citrato sintase, enzima integrante do Ciclo de Krebs, servindo como um marcador de treinamento dos animais. Embora tenhamos percebido algumas diferenças entre os animais que treinaram e os que não treinaram, um aumento esperado da citrato sintase poderá confirmar a eficiência do treinamento em gerar uma adaptação aeróbia.

Outra perspectiva é analisar a concentração de nitritos e de nitratos, componentes derivados do óxido nítrico, permitindo a avaliação da função endotelial na musculatura esquelética. O balanço entre as concentrações de espécies ativas de oxigênio e de óxido nítrico é um fator importante no desenvolvimento de doenças cardíacas e no crescimento hipertrófico. Recentemente, o mecanismo mais importante atribuído às EROs para a mudança na função endotelial é através da inativação da produção de óxido nítrico pelo ânion superóxido e por lipoproteínas oxidadas de baixa intensidade (PINHO et al., 2009). Taddei e colaboradores (2000) demonstraram que o exercício físico previne a disfunção endotelial através do reparo da disponibilidade de óxido nítrico, como uma resposta de prevenção de estresse oxidativo. Essa evidência sugere que o exercício físico pode evitar ou atenuar a redução da vasodilatação dependente do endotélio.

Por fim, pretendemos quantificar a atividade de outras defesas antioxidantes. Em nosso estudo, o aumento das espécies ativas de oxigênio, não acompanhado de um desbalanço redox, sugere que o sistema antioxidante esteja se manifestando a fim de evitar esse processo. Assim, a enzima glutathione peroxidase será avaliada e, se mais ativada, poderá ser uma das explicações para a não ocorrência de desbalanço redox observada.

## 8 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, a hipertensão arterial pulmonar foi estabelecida nesse estudo. Os animais com a doença apresentaram uma elevada pressão sistólica e diastólica ventricular direita, acompanhada de uma hipertrofia do ventrículo direito, características do modelo. O exercício físico, por sua vez, foi capaz de diminuir a pressão diastólica ventricular direita, mostrando, assim, um possível efeito benéfico dessa ferramenta na presente população.

No músculo gastrocnêmio, os resultados apontaram para um caminho distinto. Os animais com HAP apresentaram um aumento na produção de espécies ativas de oxigênio em tal musculatura. O exercício físico, além disso, a partir do protocolo realizado, acentuou a produção dessas espécies nos animais doentes, gerando dano lipídico às membranas.

A maior presença de espécies ativas de oxigênio não acarretou desbalanço redox, já que não foram observadas diferenças significativas entre a relação da glutathiona reduzida pela oxidada. Entretanto, pelas atividades das enzimas analisadas (catalase e superóxido dismutase), também não encontramos diferenças entre os diferentes grupos. Acreditamos que o sistema antioxidante pode estar agindo por outras vias, passível de ser investigado, evitando que o dano aconteça.

O presente trabalho demonstra, portanto, que, embora o exercício físico já tenha sido demonstrado como benéfico, de forma geral, em pacientes com HAP, esse artifício não parece apresentar efeitos positivos sobre o músculo gastrocnêmio de ratos tratados com monocrotalina, em decorrência do dano lipídico às membranas observado.

Esse é o primeiro estudo a avaliar o efeito do exercício físico sobre o estresse oxidativo na musculatura esquelética numa população como essa. Novas investigações são necessárias para melhor compreender os mecanismos pelos quais esses tecidos reagem frente ao exercício físico numa doença debilitante como a hipertensão arterial pulmonar, que tem a fadiga como uma de suas características primárias.

## 9 REFERÊNCIAS

AGUILÓ, A.; TAULER, P.; FUENTESPINA, E; TUR, J.P.; CÓRDOVA, A.; PONS, A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiology & Behavior*. V. 84, p. 1–7, 2005.

AKERBOOM, T.P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in Enzymology*. V. 77, p. 373-382, 1981.

ALP, P. R.; NEWSHOLME, E. A.; ZAMMIT, V. A. Activities of citrate synthase and NAD<sup>+</sup> linked and NADP<sup>+</sup> linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochemical Journal*. V.154, p.689-700, 1976.

ANVERSA, P.; LEVICKY, V.; BEGHI, C.; MCDONALD, S.L.; KIKKAWA, Y. Morphometry of exercise-induced right ventricular hypertrophy in the rat. *Circulation Research*. V. 52, p. 57-64, 1983.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.B., DAVID, J.P. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. V. 29, No. 1, p. 113-23, 2006.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochemistry*. V. 134, p. 707-716, 1973.

BUDEV, M.M.; ARROLIGA, A.C.; JENNINGS, C.A. Diagnosis and evaluation of pulmonary hypertension. *Cleveland Clinical Journal of Medicine*. V. 70 Supplement 1: S9-17, 2003.

COUILLARD, A.; MALTAIS, F.; SAEY, D; DEBIGARE, R.; MICHAUD, A.; KOECHLIN, C.; LEBLANC, P.; PRÉFAUT, C. Exercise-induced Quadriceps Oxidative Stress and Peripheral Muscle Dysfunction in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal Respir Crit Care Med*. V167, p.1664–1669, 2003.

DEL MAESTRO, R.F. An approach to Free Radicals in Medicine and Biology. *Acta Physiologica Scandinavica*. Supplement 492, p. 153-168, 1980.

EDIBERTO, N.; OLIVEIRA, S. de C. e MORAIS, R. N. Radicais livres: conceito, doenças, estresse oxidativo e antioxidantes. Disponível em [www.centrodeestudos.org.br/pdfs/oxidativo.pdf](http://www.centrodeestudos.org.br/pdfs/oxidativo.pdf). Data de acesso: 29/04/2010.

FARAHMAND, F., HILL, M.F. & SINGAL P.K. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. *Molecular and Cellular Biochemistry*. V. 260, p. 21-29, 2004.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. V. 408, p. 239-47, 2000.

FLOHÉ, L.; GUNZLER W. A. Assay of Glutathione Peroxidase. *Methods in Enzymology*. V. 105, p. 114-121, 1984.

GARCIARENA, C.D.; PINILLA, O.A.; NOLLY, M.B.; LAGUENS, R.B.; ESCUDERO, E.M.; CINGOLANI, H.E.; ENNIS. I.L. Endurance Training in the Spontaneously Hypertensive Rat Conversion of Pathological into Physiological Cardiac Hypertrophy. *Hypertension*. V. 53, p. 708 – 714, 2009.

GOLDIM, J.R. & RAIMUNDO, M.M. Pesquisa em saúde e direito dos Animais 2<sup>a</sup> ed. HCPA, Porto Alegre, RS, 1997.

GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart and muscle. *Free Radical Biology & Medicine*. V. 10, p. 41-47, 1991.

GRANGER, D.L.; ANSTEY, N.M.; MILLER, W.C; WEINBERG, J.B. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods in Enzymology*. V. 301, p. 58-61, 1999.

HALLIWELL, B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by

reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutation Research*. V. 443, p. 37–52, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 3 ed. New York: Oxford, 1999.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. *Lancet*. V. 355, p. 1179-80, 2000.

HANDOKO M.L.; DE MAN F.S.; HAPPÉ C.M.; SCHALIJ I.; MUSTERS R.J.; WESTERHOF N.; POSTMUS P.E.; PAULUS W.J.; VAN DER LAARSE W.J.; VONK-NOORDEGRAAF A. Opposite effects of training in rats with stable and progressive pulmonary hypertension. *Circulation*. V. 120, p. 42-9, 2009.

LEO M. A. HEUNKS, L.M.A.; VIÑA, J. HERWAARDEN, C.L.A., FOLGERING, H.T.M. GIMENO, A.; DEKHUIJZEN, P.N.R. Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. V. 277, p.1697-1704, 1999.

HILL, N.S.; JEDERLINIC, P.; GAGNON, J. Supplemental oxygen reduces right ventricular hypertrophy in monocrotaline-injected rats. *Journal Applied of Physiology*. V. 66(4), p. 1642-48, 1989.

JASMIN, J.F; CERNACEK, P.; DUPUIS, J. Activation of the right ventricular endothelin (ET) system in the monocrotaline model of pulmonary hypertension: response to chronic ETA receptor blockade. *Clinical Science*. V. 105, p. 647-653, 2003.

JONES, D.P. Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. V. 295, p. 849-68, 2008.

JONG, J.W.; SCHOEMAKER, R.G.; JONGE, R.; BERNOCHI, P.; KEIJZER, E.; HARRISON, R.; SHARMA, H.S.; CECONI, C. Enhanced expression and activity of xantine oxireductase in the failing heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. V. 32, p. 2083-89, 2000.

KAUL, N.; SIVESKI-ILISKOVIC, N.; HILL, M.; SLEZAK, J., SINGAL, P.K. Free radicals and the heart. *Journal of Pharmacology and Toxicology Methods*. V. 30, p. 55-67, 1993.

KAYATEKIN, B.M.; GÖNENÇ, S.; AÇIKGÖZ, O., et al. Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. *European Journal of Applied Physiology*. V. 87, p.141–44, 2002.

KOJDA, G.; HAMBRECHT, R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as na effective antioxidant therapy? *Cardiovascular Research*. V. 67, p. 187-97, 2005.

LLESUY, S.F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOVERIS, A.; MILEI, S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori*. V. 71, p. 241-249, 1985.

LÜDKE, A.R.L. Avaliação da administração de suco de uva e modelo experimental de hipertensão pulmonar – papel do óxido nítrico e estresse oxidativo. 2007. 126f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

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

MANEGHINI, R. A toxicidade do Oxigênio. *Ciência Hoje*. V. 5, p. 57-62, 1987.

MARKLUND, S. Handbook of methods for oxygen radical research. *CRC Press online*. p. 243-247, 1985.

MATHEW, R.; ZEBALLOS, G.A.; TUN, H.; GEWITZ, M.H. Role of nitric oxide and endothelin-1 in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Cardiovascular Research*. V. 30, p. 739-746, 1995.

MCLURE L.E.; PEACOCK, A.J. Imaging of the heart in pulmonary hypertension. *International Journal of Clinical Practice*. V. 61, p. 15–26, 2007.

MERELES D.; EHLKEN N.; KREUSCHER S.; GHOFRANI S.; HOEPER M.M.; HALANK M.; MEYER F.J.; KARGER G.; BUSS J.; JUENGER J.; HOLZAPFEL N.; OPITZ C.; WINKLER J.; HERTH F.F.; WILKENS H.; KATUS H.A.; OLSCHIEWSKI H., GRÜNIG E. Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Circulation*. V. 114, p. 1482-9, 2006.

MENEGHINI, R. A toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje*. V. 5, p. 57-62, 1987.

MONNET, E.; CHACHQUES, J.C. Animal models of heart failure: What is new? *The Annals of Thoracic Surgery*. V. 79, p. 1445-53, 2005.

NAUSER, T.D.; STEVEN, W.S. Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension. *American family physician*. V. 63, n. 9, p. 1789-98, 2001.

PADMAVATI S.; PATHAK, S.N. Chronic Cor Pulmonale in Delhi: A Study of 127 Cases. *Circulation*. V. 20, p. 343-352, 1959.

PALEVSKY, H.I.; FISHMAN, A.P. Chronic Cor Pulmonale: Etiology and Management. *Journal of American Medical Association*. V. 263, p. 2347-53, 1990.

PAN, L.C.; WILSON, D.W.; LAME, M.W.; JONES, A.D.; SEGALL, H.J. Cor pulmonale is caused by monocrotaline and dehydromonocrotaline, but not by glutathione or cysteine conjugates of dihydropyrrrolizine. *Toxicology and Applied Pharmacology*. V. 118, p. 87-97, 1993.

PICHARDO, J.; PALACE, V.; FARAHMAND, F.; SINGAL, P. K. Myocardial oxidative stress changes during compensated right heart failure in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. V. 196, p. 51-57, 1999.



PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of Immunological Methods*. V. 38, p. 161-170, 1980.

PINHO, R.A.; ARAÚJO, M.C.; GHISI, G.L.M.; BENETTI, M. Coronary Heart Disease, Physical Exercise and Oxidative Stress. *Arq Bras Cardiol*. V. 94, p. 515-521, 2010.

MARGARET F. RAMOS M.F.; LAME, M.W.; SEGALL, H.J.; WILSON, D.W. Smad Signaling in the Rat Model of Monocrotaline Pulmonary Hypertension. *Toxicologic Pathology*. V. 36, p. 311-20, 2008.

RICH, S. Executive summary from the World Symposium on Primary Pulmonary Hypertension, Evian, France, September 6-10, 1998, co-sponsored by The World Health Organization. In: Barst, R.J.; MCGOON, M.; TORBICKI, A.; SITBON, O.; KROWKA, M.J.; Olschewski, H.; GAINE, S. Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. V. 43. p. 40s-47s, 2004.

RAMOS, M.F.; LAMÉ, M.W.; SEGALL, H.J.; WILSON, D.W. Smad Signaling in the Rat Model of Monocrotaline Pulmonary Hypertension. *Toxicologic Pathology*. V. 36, p. 311-320, 2008.

RODRIGUES, B.; FIGUEROA, D.M.; MOSTARDA, C.T.; HEEREN, M.V.; IRIGOYEN, M.C.; DE ANGELIS, K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovascular Diabetology*. V. 13, p. 1-7, 2007.

RUBIN, L.J. Current Concepts: Primary pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine*. V. 336, p. 111-117, 1997.

SCHANNWELL, C.M.; STEINER, S., STRAUER, B.E. Diagnostics in pulmonary hypertension. *Journal of physiology and pharmacology*. V. 58, p. 591-602.

SHAPIRO, L.M. Physiological left ventricular hypertrophy. *British Heart Journal*. V. 52,

p. 130-135, 1984.

SIMONNEAU, G., ROBBINS I.V., BEGHETTI M., CHANNICK R.N., DELCROIX M., DENTON, C.P., ELLIOTT C.G. , GAINE, S.P.; GLADWIN, M.T.; JING, Z.; KROWKA, M.J.; LANGLEBEN, D.; NAKANISHI, N.; SOUZA, R. Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, V. 54, n.1, p. S43-54, 2009.

SINGAL, K.P.; KHAPER, N.; BELLÓ-KLEIN, A.; BHAYANA, M. Oxidative stress status in the transition of hypertrophy to heart failure. *Heart Failure Reviews*. V. 4, p. 353-360, 1999.

SMITH, C.; MARKS, A.D.; LIEBERMAN, M. *Mark's Basic Medical Biochemistry: a clinical approach*. 2ª Ed. Editora Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

SOUZA-RABBO, Maristela Padilha. *Efeitos do treinamento físico no perfil hemodinâmico e no estresse oxidativo em modelo experimental Cor pulmonale*. 2005. 70f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005.

SOUZA-RABBO M.P.; SILVA, L.F.F.; AUZANI, J.A.S.; PICORAL, M.; KHAPER, N.; BELLÓ-KLEIN, A. Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. V. 35, n. 8, p. 944-948, 2008.

Taddei, S.; Galetta, F.; Viridis, A.; Ghiadoni, L.; Salvetti, G.; Franzoni, F. Physical activity prevents age-related impairment in nitric oxide availability in elderly athletes. *Circulation*. V. 101, p. 2896-901, 2000.

WILSON, D.W.; SEGALL, H.J.; PAN, L.C; LAME, M.W.; ESTEP, J.E.; MORIN, D. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*. V. 22, p. 307–25, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chronic cor pulmonale. A report of the expert committee. *Circulation* 2: 594-598, 1963.