

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Rosalia Lempk Constantin

**ANÁLISE TEMPORAL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA MUSCULATURA  
ESQUELÉTICA DE RATOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR  
INDUZIDA POR MONOCROTALINA**

Porto Alegre  
2023

Rosalia Lempk Constantin

**ANÁLISE TEMPORAL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA MUSCULATURA  
ESQUELÉTICA DE RATOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR  
INDUZIDA POR MONOCROTALINA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientadora: Dra. Adriane Belló-Klein  
Coorientadora: Dra. Alexandra Zimmer

Porto Alegre  
2023

### CIP - Catalogação na Publicação

Constantin, Rosalia Lempk  
ANÁLISE TEMPORAL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA  
MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATOS COM HIPERTENSÃO  
ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA / Rosalia  
Lempk Constantin. -- 2023.  
86 f.  
Orientadora: Adriane Belló-Klein.

Coorientadora: Alessandra Zimmer.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,  
Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Hipertensão Arterial Pulmonar. 2. Monocrotalina.  
3. Músculo Esquelético. 4. Estresse Oxidativo. 5.  
Atrofia Muscular. I. Belló-Klein, Adriane, orient.  
II. Zimmer, Alessandra, coorient. III. Título.

Rosalia Lempk Constantin

**ANÁLISE TEMPORAL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA MUSCULATURA  
ESQUELÉTICA DE RATOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR  
INDUZIDA POR MONOCROTALINA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: 29 de setembro de 2023.

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Cristina Campos Carraro (UFRGS)

Prof. Dr. Patrick Türck (ULBRA)

Orientadora Profa. Dra. Adriane Belló-Klein (UFRGS)

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho de conclusão de curso à todos os professores que contribuíram para minha formação como Biomédica. Desde aqueles do jardim de infância, seguido dos do ensino fundamental, do ensino médio, do pré-vestibular e da graduação em Biomedicina da UFRGS. Todos eles deram-me alicerces sólidos para seguir na longa jornada em busca do conhecimento. E esses profissionais merecem não só dedicatórias em trabalhos, mas principalmente o respeito e a valorização de toda a sociedade, locais, condições de trabalho e remuneração dignos da grandeza e da responsabilidade da profissão.

Dedico também aos profissionais de saúde das mais variadas formações, principalmente aqueles que seguem a ética e a medicina baseada em evidências científicas. No auge da pandemia de COVID-19, estavam na linha de frente, exaustos, frustrados por não dispor de tratamentos de eficácia comprovada. Mesmo assim, estavam apostos, recebendo os muitos pacientes que chegavam em condições críticas. Muitos perderam a vida exercendo sua profissão.

Também dedico aos cientistas e pesquisadores, que trabalham incessantemente em busca de respostas, novos alvos farmacológicos, fármacos mais direcionados aos alvos, terapias mais efetivas e com menores efeitos colaterais. O desenvolvimento recorde de vacinas contra o SARS-COV-2 mostrou o poder da ciência baseada em evidências e a responsabilidade em criar alternativas seguras para a utilização em massa.

E dedico também aos pacientes portadores da hipertensão pulmonar, de qualquer classe. À medida que estudava essa patologia, ficava cada vez mais clara a sua complexidade e gravidade. Por isso, a comunidade científica deveria dar maior atenção à pesquisa sobre a hipertensão pulmonar. Inclusive, apresentá-la ao público em geral, visto que grande parte da população sequer tem conhecimento da existência da doença.

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer minha mãe, Susana Lempk, e meu pai, Carlinhos Luiz Constantin. Por todo o amor, pela presença, pela dedicação e pelos sacrifícios que tiveram de fazer para que nada me faltasse. Nunca faltou compreensão e apoio às minhas escolhas, nunca faltou o zelo pela minha saúde, nunca faltou o investimento em minha educação e conhecimento. Sempre tentaram me guiar para o caminho do respeito, da responsabilidade, da ética e da cidadania. Muitas vezes os conselhos foram palavras duras, mas com a intenção do amor e cuidado por mim. Obrigada mãezinha e paizinho, o amor que tenho por vocês não tem medida, é infinito!

Quero agradecer minha irmã, Carla Lempk Constantin. Mais do que irmãs, somos as melhores amigas. Nunca houve competição e ciúmes entre nós. Pelo contrário, nós sempre nos apoiamos, trocamos conhecimento e torcemos uma pela outra. Teve papel importante neste TCC, auxiliando-me, de forma brilhante, a entender os parâmetros ecocardiográficos que estão na introdução deste trabalho. Mana, tu és uma pessoa iluminada, inteligente, dedicada. Segue firme na tua caminhada. Te amo demais!

Ao meu cunhado, Leandro Haczkiwicz Gaiga, pelo apoio, humor, boas conversas e tentativas de me lançar aos esportes aquáticos, como aulas de surfe. Valeu cunha!

À minha orientadora, Profa. Dra. Adriane Belló-Klein, não tenho como expressar o tamanho da minha gratidão. Obrigada por me escolher como IC, por acreditar no meu trabalho e dedicação, pela paciência, pelos conhecimentos, pelos conselhos. Sempre dizendo que tudo tinha um propósito e o tempo certo de acontecer, que bastava eu ter calma e seguir firme, acreditando. A senhora foi a melhor orientadora do universo. Obrigada profe, a senhora foi como uma mãe para mim!

À minha coorientadora, Dra. Aleksandra Zimmer, quero agradecer pelo exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa. No meio de tantos experimentos, acabamos nos tornando amigas. Aprendi muito ao teu lado Ale, muito obrigada!

Agradeço aos membros do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular: Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo, Prof. Dr. Paulo Cavalheiro Schenkel, Prof. Dr. Alexandre Luz de Castro, Profa. Dra. Cristina Campos Carraro, Prof. Dr. Patrick Türck, Dra. Giana Blume Corssac, Dra. Vanessa Duarte Ortiz, Me. Sílvio Tasca e Téc. Tânia Regina Gattelli Fernandes Piedras. Sempre me senti em casa no lab, obrigada pelos ensinamentos que vocês todos me passaram!

Aos amigos Yasmine Massaro Carneiro Monteiro, Marcel de Medeiros de Mattos, Priscila dos Santos Silveira, Débora Ribeiro dos Santos e Ma. Thaisla Cristiane Borella da Silva. Obrigada pelo companheirismo, apoio, lealdade, humor e boas conversas!

## RESUMO

**Introdução:** A hipertensão arterial pulmonar (HAP) se caracteriza por remodelamento das pequenas artérias e arteríolas pulmonares, vasoconstrição, aumento da resistência vascular e diminuição da complacência, levando ao aumento da pressão arterial pulmonar média. Intolerância ao exercício e fraqueza muscular são encontradas em pacientes e em modelos animais de indução à HAP. Um dos modelos de indução da HAP é através da administração de monocrotalina (MCT) em ratos. Assim como em humanos, animais doentes demonstram alterações ao nível da musculatura esquelética. **Objetivos:** Avaliação temporal do estresse oxidativo nos músculos diafragma e gastrocnêmio em ratos com HAP induzida por MCT. **Metodologia:** 48 ratos Wistar machos, pesando aproximadamente 180 gramas (g), foram divididos em grupos Controle (CTR) e MCT 7, 14 e 21 dias. A indução da HAP foi realizada através da administração intraperitoneal de única dose de MCT (60 mg/Kg). Após eutanásia, nos 7°, 14° e 21° dias, músculos diafragma e gastrocnêmio foram colhidos, limpos e pesados. Análises bioquímicas realizadas nesses músculos foram: níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), lipoperoxidação (TBARS), atividades da NADPH oxidase (NOX), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) e concentração de sulfidrilas. **Resultados:** O peso do gastrocnêmio foi menor nos animais MCT 21 dias e o diafragma não apresentou diferenças em relação aos controles, em todos os tempos medidos. Atividade da NOX aumentou em relação aos controles, em todos os tempos medidos no diafragma e apenas no MCT 21 no gastrocnêmio. Níveis de EROs não apresentaram diferenças em relação aos controles no diafragma mas aumentaram no MCT 7 no gastrocnêmio. No 7° dia, aumentou TBARS nos animais MCT em relação aos controles tanto no diafragma quanto no gastrocnêmio. Níveis de sulfidrilas não apresentaram diferenças em relação aos controles em ambos os músculos. No 21° dia, aumentou atividade da SOD em relação ao controle e demais tempos no diafragma, estando esta aumentada apenas no MCT 7 no gastrocnêmio. A atividade da CAT reduziu no MCT 7 e no MCT 14, respectivamente no diafragma e gastrocnêmio, em relação ao controle. No 21° dia, aumentou atividade da GPx em relação ao controle no diafragma e no MCT 7 no gastrocnêmio; enquanto que esta se mostrou reduzida para MCT 14 e MCT 21 no gastrocnêmio. **Conclusão:** Os principais resultados demonstram que, na musculatura esquelética, a HAP leva a mudanças no estado redox celular. O diafragma apresentou melhor proteção contra a oxidação pois, apesar da atividade da NOX estar maior em todos os tempos medidos, não houve aumento de EROs e, aos 21 dias, as atividades da SOD e da GPx aumentaram. O gastrocnêmio demonstrou maior susceptibilidade à oxidação. Apesar de controlar o aumento de EROs e de TBARS entre o 7° e o 14° dia, no 21° dia, a atividade elevada da NOX em conjunto com a reduzida atividade da GPx gera ambiente pró-oxidante. Este ambiente pró-oxidante pode estar contribuindo para os mecanismos de perda de massa muscular.

Palavras-chave: hipertensão arterial pulmonar; monocrotalina; músculo esquelético; estresse oxidativo; atrofia muscular.

## ABSTRACT

**Introduction:** Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by remodeling of small pulmonary arteries and arterioles, vasoconstriction, increased vascular resistance and decreased compliance, which leads to elevation of mean pulmonary arterial pressure. Exercise intolerance and muscle weakness are found in patients and is a common feature in inducible PAH animal models. One of these models is achieved via administration of monocrotaline (MCT) in rats. Like humans, sick animals show alterations on skeletal muscles. **Objectives:** To perform temporal evaluation of oxidative stress in diaphragm and gastrocnemius muscles of rats with PAH induced by MCT. **Methodology:** 48 male Wistar rats, with approximately 180 g of corporal weight, were divided in Control (CTR) and (MCT) groups 7, 14 and 21 days. PAH induction occurred through intraperitoneal administration of a single dose of MCT (60 mg/Kg). After euthanasia, on 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>th</sup> days, diaphragm and gastrocnemius muscles were harvested, washed and weighted. The biochemical analysis performed in these muscles were: levels of reactive oxygen species (ROS); lipoperoxidation (TBARS); NADPH oxidase (NOX), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) activities; and concentration of sulfhydryls. **Results:** Gastrocnemius' weight was reduced in MCT 21 animals whereas diaphragm did not show differences compared with controls in all measured times. NOX activity increased compared with controls, in all time points in diaphragm, and only in MCT 21 in gastrocnemius. ROS levels did not show differences compared with controls in diaphragm, but enhanced in MCT 7 in gastrocnemius. On the 7<sup>th</sup> day, TBARS increased in MCT animals compared with controls, both in diaphragm and gastrocnemius. Sulfhydryl levels did not show differences compared with controls in both muscles. On 21<sup>th</sup> day, SOD activity increased compared with control and with the other time points in diaphragm, whereas enhanced in gastrocnemius only in MCT 7. CAT activity reduced in MCT 7 and MCT 14, in diaphragm and in gastrocnemius respectively, compared with controls. On 21<sup>th</sup> day, GPx activity enhanced, compared with control in MCT 7 in gastrocnemius, whereas there was a reduction of this enzyme activity in MCT 14 and MCT 21 for the same muscle. **Conclusion:** The main results demonstrate that, in skeletal muscles, PAH induces changes in cellular redox status. The diaphragm displayed better protection against oxidation because, although NOX activities were higher in all time points, there were no ROS elevation and, on the 21<sup>th</sup> day, SOD and GPx activities enhanced. The gastrocnemius showed higher susceptibility to oxidation. Even though it controlled the enhancement of ROS and TBARS among the 7<sup>th</sup> and the 14<sup>th</sup> days, on 21<sup>th</sup> day the elevated activity of NOX together with a reduced activity of GPx leads to a pro-oxidant environment. This pro-oxidant environment may be contributing to the loss of muscular mass mechanisms.

**Keywords:** pulmonary arterial hypertension; monocrotaline; skeletal muscle; oxidative stress; muscle atrophy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Remodelamento das pequenas artérias e arteríolas pulmonares.....	23
Figura 2 – Vias de sinalização envolvidas no remodelamento vascular.....	24
Figura 3 – Evolução das alterações do ventrículo direito na hipertensão arterial pulmonar ...	26
Figura 4 – Sistema antioxidante enzimático .....	29
Figura 5 – Sistema antioxidante baseado em sulfidrilas .....	30
Figura 6 – Farmacocinética e farmacodinâmica do modelo de indução da hipertensão arterial pulmonar por monocrotalina .....	33

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação da hipertensão pulmonar segundo 6º Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar .....	17
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AD: átrio direito

AKT: proteína cinase B

AT/ET: razão entre o tempo de aceleração do fluxo sanguíneo e o tempo de ejeção total

AT: tempo de aceleração do fluxo sanguíneo

ATP: trifosfato de adenosina

CAT: catalase

CoQ10: coenzima Q10

CTR: controle

CYP450: citocromo P-450

DC: débito cardíaco

DDVD: diâmetro diastólico do ventrículo direito

E/A: razão entre a velocidade máxima de enchimento rápido e a velocidade máxima de enchimento lento

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

ERNs: espécies reativas de nitrogênio

EROs: espécies reativas de oxigênio

ET: tempo de ejeção total

ET-1: endotelina 1

ETAR: receptor A de endotelina-1

EVE: elastase vascular endógena

FEVE: fração de ejeção ventricular esquerda

FGF-2: fator de crescimento de fibroblastos 2

Foxo3: forkhead box subclasse O3

GPx: glutathione peroxidase

GR: glutathione reductase

Grx: glutaredoxina

GSH: glutathione reduzida

-GSH: S-glutathionilação

GSSG: glutathione oxidada

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

HAP: hipertensão arterial pulmonar

Hb: hemoglobina

HIV: vírus da imunodeficiência adquirida  
HOCl: ácido hipocloroso  
IL-1: interleucina 1  
IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta  
IL-6: interleucina 6  
IL-10: interleucina 10  
IL-12: interleucina 12  
LDH: lactato-desidrogenase  
LDL: lipoproteína de baixa densidade  
MCT: monocrotalina  
MCTP: dehidromonocrotalina  
MEC: matriz extracelular  
Mfn1: mitofusinas 1  
Mfn2: mitofusinas 2  
mmHg: milímetros de mercúrio  
MMP: metaloproteinases  
MuRF-1: proteína-1 muscular RING-finger  
NADPH: dinucleotídeo de nicotinamida adenina reduzido  
NIH: National Institutes of Health  
NLRs: receptores do tipo NOD  
NO: óxido nítrico  
•NO: radical óxido nítrico  
NOX: NADPH oxidase  
NYHA: New York Heart Association  
O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>: radical superóxido  
•OH: radical hidroxil  
ONOO<sup>-</sup>: peroxinitrito  
PAPm: pressão arterial pulmonar média  
PCAP: pressão de encunhamento arterial  
PDFVD: pressão diastólica final do ventrículo direito  
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas  
PDH: piruvato-desidrogenase  
PECAM-1: molécula de adesão celular endotelial plaquetária  
PGI<sub>2</sub>: prostaciclina

PIP3K: fosfoinosítideo 3-cinase  
PO<sub>2</sub>: pressão parcial de oxigênio  
PPAR $\gamma$ : receptor ativado por proliferadores de peroxissomos gama  
Prx 6: peroxiredoxina 6  
Prx: peroxiredoxina  
PSVD: pressão sistólica do ventrículo direito  
RAGEs: receptores de produtos de glicação avançada  
ROO<sup>•</sup>: radical peroxil  
RVP: resistência vascular pulmonar  
-SH: grupamento tiol  
-SNO: S-nitrosilação  
-SO<sub>2</sub>H: ácido sulfínico  
-SO<sub>3</sub>H: ácido sulfônico  
SOD: superóxido dismutase  
-SOH: ácido sulfênico  
t<sub>1/2</sub>: tempo de meia-vida  
TAPSE: excursão sistólica do plano anular da tricúspide  
TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TGF- $\beta$ : fator de crescimento transformante beta  
TLRs: receptores do tipo Toll  
TN-C: tenascina C  
TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa  
Trx: tioredoxina  
TrxR: tioredoxina redutase  
TXA<sub>2</sub>: tromboxano A<sub>2</sub>  
VD: ventrículo direito  
VE: ventrículo esquerdo  
VE-caderina: caderina endotelial vascular  
WHO-FC: World Health Organization Functional Class  
WU: unidades Wood  
XO: xantina oxidase

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA</b> .....	15
1.1 Hipertensão Pulmonar.....	15
1.1.1 Definição.....	15
1.1.2 Classificação .....	16
1.2 Hipertensão Arterial Pulmonar .....	18
1.3 Fisiologia da Circulação Pulmonar e do Ventrículo Direito.....	20
1.4 Fisiopatologia da Hipertensão Arterial Pulmonar .....	22
1.4.1 Alterações na Circulação Pulmonar na Hipertensão Arterial Pulmonar.....	22
1.4.2 Alterações no Ventrículo Direito na Hipertensão Arterial Pulmonar.....	25
1.5 Estresse Oxidativo .....	27
1.5.1 Conceito de Estresse Oxidativo .....	27
1.5.2 Fontes de Espécies Reativas de Oxigênio e Espécies Reativas de Nitrogênio e Sistemas Antioxidantes Enzimáticos .....	27
1.5.3 Sistemas Antioxidantes Não-Enzimáticos e Sulfidrilas .....	29
1.6 Modelo de Indução da Hipertensão Arterial Pulmonar por Monocrotalina .....	32
1.6.1 Intoxicação por Alcaloides Pirrolizidínicos.....	32
1.6.2 Monocrotalina.....	32
1.6.3 Modelo de Hipertensão Arterial Pulmonar .....	33
1.6.4 Alterações Temporais Causadas por Monocrotalina .....	34
1.6.4.1 Alterações Pulmonares .....	34
1.6.4.2 Alterações Cardíacas do Ventrículo Direito .....	35
1.7 Músculo Estriado Esquelético e Hipertensão Arterial Pulmonar .....	37
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	40
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	41
3.1 Objetivo geral .....	41
3.2 Objetivos específicos .....	41
<b>4 ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	42
<b>5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	63
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	64
<b>ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY</b> .....	73

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Hipertensão Pulmonar

### 1.1.1 Definição

Os primeiros relatos e evidências de uma patologia misteriosa que parecia acometer pulmões e coração remontam do final do século 19. Os pacientes apresentavam sintomas clínicos semelhantes, como dispneia severa, fadiga crônica e cianose. Na época, já era notável a alta mortalidade dos acometidos e em necropsias os patologistas encontravam sinais de hipertrofia ventricular direita e lesões nos vasos pulmonares. Várias evidências foram produzidas relacionando a patologia misteriosa com doenças pulmonares, doenças cardíacas esquerdas, esquistossomose, altas altitudes e origens desconhecidas. Entretanto, o termo “hipertensão pulmonar” era considerado apenas hipotético, pois não havia uma forma de medir diretamente as pressões arteriais pulmonares. Em 1945, com a descoberta de um método seguro para o cateterismo cardíaco, foi possível aferir as pressões pulmonares. O próximo passo foi tentar categorizar a hipertensão pulmonar em subtipos. A primeira tentativa, em 1959, categorizou 3 tipos de hipertensão pulmonar: a passiva, causada por situações que aumentavam a pressão pulmonar venosa; a hiperkinética, causada pelo alto fluxo sanguíneo pulmonar devido a *shunts* da esquerda para a direita; e a oclusiva. Esta última subdividia-se em 4 classes: obliterativa, com lesões ou remodelamento dos vasos pulmonares *per se*; vaso constritiva, com contração hiper-reativa da camada muscular; obstrutiva, com trombos de origem local ou de fora do pulmão; e poligênica, com diversas causas. Na Europa de 1960, o fármaco supressor de apetite (*Aminorex*) provocou aumentos na incidência de hipertensão pulmonar na ordem de 20 vezes, e deste modo trouxe atenção e interesse das ciências biomédicas ao terreno pouco conhecido da hipertensão pulmonar (HEWES et al., 2020).

Desde o 1º Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar, de 1973, a definição e a classificação de subtipos de hipertensão pulmonar vêm sendo aprimoradas. Segundo o 6º Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar, de 2018, a hipertensão pulmonar é uma condição patológica na qual o paciente apresenta pressão arterial pulmonar média (PAPm)  $\geq$

20 milímetros de mercúrio (mmHg) em repouso, medida pelo cateterismo do ventrículo direito (VD). Ainda, pode ser subclassificada como pré-capilar ou pós-capilar, baseada na pressão de encunhamento arterial pulmonar (PCAP) (HOEPER et al., 2016; MONTANI et al., 2013; SYSOL et al., 2018). Para verificar as PCAP pré-capilares insere-se um cateter com balão pela veia braquial, pela veia jugular ou ainda pela veia femoral. O cateter segue até que o balão oclua uma pequena artéria pulmonar, deste modo aferindo a pressão que provém do VD e da artéria pulmonar. Para verificar as PCAP pós-capilares, o cateter afere a pressão retrógrada que provém do ventrículo esquerdo (VE) no final da diástole e se reflete para o átrio esquerdo e para as veias e capilares pulmonares (SANZ et al., 2019). Se  $PCAP \leq 15$  mmHg a hipertensão pulmonar é dita pré-capilar, mas se  $PCAP > 15$  mmHg a hipertensão pulmonar é dita pós-capilar (HOEPER et al., 2016; MONTANI et al., 2013; SYSOL et al., 2018).

### 1.1.2 Classificação

Em 1973, em Genebra, na Suíça, cientistas e médicos reuniram-se em um encontro da Organização Mundial de Saúde para debater os relatos e as evidências de estudos sobre a hipertensão pulmonar. A principal discussão do 1º Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar se centrava na definição e na classificação de subtipos de hipertensão pulmonar, baseada nas etiologias e nas apresentações morfológicas (HEWES et al., 2020).

Várias origens etiológicas estão associadas ao desenvolvimento de hipertensão pulmonar. Desde o 1º simpósio, a categorização de subtipos tem sido cada vez mais pormenorizada. As categorias se baseiam na etiologia, na apresentação clínica, nas características hemodinâmicas e no manejo terapêutico (HOEPER et al., 2016; MONTANI et al., 2013; SIMONNEAU et al., 2019; SYSOL et al., 2018). Segundo o 6º Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar, em 2018, a hipertensão pulmonar pode ser dividida em 5 grupos (Quadro 1).

Quadro 1 - Classificação da hipertensão pulmonar segundo 6º Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar

<b>Classificação da Hipertensão Pulmonar</b>	
<b>Grupo 1</b>	Idiopática, genética, induzida por drogas ou toxinas, associada a doenças de tecido conjuntivo, associada à infecção por HIV, associada à esquistossomose, associada à hipertensão portal, associada às doenças cardíacas congênitas e hipertensão pulmonar persistente da síndrome do recém-nascido
<b>Grupo 2</b>	Doenças cardíacas esquerdas: insuficiência cardíaca com fração de ejeção ventricular esquerda (FEVE) preservada, insuficiência cardíaca com FEVE reduzida, doenças valvares e condições cardiovasculares congênitas ou induzidas que levam à hipertensão pulmonar pós-capilar
<b>Grupo 3</b>	Doenças pulmonares ou a condições de hipóxia: doença pulmonar obstrutiva, doença pulmonar restritiva, doença pulmonar mista obstrutiva/restritiva, hipóxia e doenças do desenvolvimento pulmonar
<b>Grupo 4</b>	Tromboembolismo crônico ou a outras obstruções da artéria pulmonar
<b>Grupo 5</b>	Origens não conhecidas ou multifatoriais: doenças hematológicas, doenças metabólicas, doenças cardíacas congênitas complexas

Fonte: HOEPER et al., 2016; MONTANI et al., 2013; SIMONNEAU et al., 2019; SYSOL et al., 2018

## 1.2 Hipertensão Arterial Pulmonar

Hipertensão arterial pulmonar (HAP) é o subtipo de hipertensão pulmonar classificado atualmente como Grupo 1. Os pacientes são diagnosticados através do procedimento de cateterismo do VD que acusa  $PAPm \geq 20$  mmHg em repouso. A  $PCAP \leq 15$  mmHg faz da HAP uma doença que eleva as pressões arteriais pulmonares em níveis pré-capilares, ou seja, em pequenas artérias e arteríolas (HOEPER et al., 2016; LAU et al., 2017; MONTANI et al., 2013; SYSOL et al., 2018).

A HAP é rara, com prevalência de 15 a 50 casos por milhão de indivíduos. Nos países ocidentais a forma mais comum de HAP é a idiopática, responsável por 30 a 50% dos casos. Na China, a forma mais comum de HAP é a associada a doenças cardíacas congênitas, responsável por 43% dos casos. No Brasil, a primeira causa de HAP é a idiopática, seguida da associada a doenças do tecido conjuntivo e da associada à esquistossomose, esta última contando com 20% dos casos (LAU et al., 2017).

Segundo o *National Institutes of Health* (NIH), inicialmente a HAP idiopática era diagnosticada em indivíduos jovens ou de meia idade, com idade média de  $35 \pm 15$  anos (RICH, 1987). Entretanto, vários países têm registrado aumento nas idades médias ao diagnóstico: a França registrou média de  $52 \pm 15$  anos (HUMBERT et al., 2010), os Estados Unidos registrou média de  $53 \pm 15$  anos (BADESCH et al., 2010) e o Reino Unido registrou um aumento na média de 45 para 52 anos (LING et al., 2012). O aumento na idade média ao diagnóstico é um fator prognóstico negativo, pois indivíduos mais velhos tendem a apresentar comorbidades clássicas como hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus tipo 2, obesidade, enfisema pulmonar, doença pulmonar obstrutiva crônica (LAU et al., 2017).

Em relação ao gênero, mulheres são mais afetadas pela HAP idiopática numa proporção que varia de 62 a 80% dos casos (BADESCH et al., 2010; LEE et al., 2012; PEACOCK et al., 2007). Porém, a taxa de mortalidade é maior em homens (LAU et al., 2017). Há estudos que demonstram a influência dos hormônios sexuais femininos como fatores de proteção cardiovascular, desta forma deixando indivíduos do sexo feminino mais resistentes aos danos da HAP. Com maior prevalência, mas menor mortalidade, o efeito é denominado de “Paradoxo do Estrogênio” (SAKAO e al., 2010; VENTETUOLO, 2011).

Antes do desenvolvimento de fármacos específicos para a enfermidade, a HAP apresentava altas taxas de mortalidade, com média de sobrevivência de 2,8 anos (HEWES et al., 2020; LAU et al., 2017; MONTANI et al., 2013). Os tratamentos disponíveis têm como

alvos a via do óxido nítrico (NO) (*sildenafil, tadalafil, riociguat*), a via da endotelina-1 (ET-1) (*bosentan, ambrisentan, macitentan*) e a via da prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (*epoprostenol, treprostinil, iloprost, selexipag*) (HEWES et al., 2020; LAN et al., 2018).

A compreensão da complexa fisiopatologia da HAP deve começar com uma revisão da fisiologia da circulação pulmonar e da função ventricular direita, abordada nos próximos tópicos.

### 1.3 Fisiologia da Circulação Pulmonar e do Ventrículo Direito

As trocas gasosas pulmonares ocorrem através de uma fina membrana respiratória, da qual fazem parte as delgadas membranas basais do endotélio capilar e das células alveolares. Se, neste sistema, o fluxo sanguíneo estivesse sob altas pressões, haveria extravasamento de fluido para o interior do alvéolo e edema. Deste modo, as forças evolutivas moldaram a circulação pulmonar de forma a torná-la um sistema capaz de comportar grandes volumes e fluxos de sangue (alta complacência), sob baixas pressões (baixa resistência) (GREYSON, 2010; NAEIJE, 2013; THENAPPAN et al., 2016).

Na circulação pulmonar, a resistência é controlada pelo tônus das células musculares lisas da camada média das pequenas artérias e arteríolas. O tônus é responsivo às substâncias vasodilatadoras, como NO e PGI<sub>2</sub>, bem como às vasoconstritoras, como ET-1 e tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (GREYSON, 2010). A resistência vascular pulmonar (RVP) pode ser calculada pela equação:

$$RVP = (PAPm - PCAP) \div DC$$

Onde PAPm é a pressão arterial pulmonar média, PCAP é a pressão de encunhamento arterial pulmonar e DC é o débito cardíaco. De acordo com o 6º Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar, a RVP também deve ser incluída na definição de hipertensão pulmonar pré-capilar e pós-capilar. Quando  $RVP > 3$  Unidades Wood (WU) a hipertensão pulmonar é pré-capilar, mas quando  $RVP < 3$  WU a hipertensão pulmonar é pós-capilar (CONDON et al., 2019; GREYSON, 2010; NAEIJE, 2013).

A complacência é a razão entre variação de volume e variação de pressão em um sistema e, nas pequenas artérias e arteríolas pulmonares, esta razão é alta. Significa que o volume de sangue ejetado do VD para as artérias não eleva de forma significativa as pressões dentro do sistema. Ainda, a alta complacência diminui ondas retrógradas geradas pela sístole do VD, reduzindo a pós-carga. Neste aspecto, um artigo de revisão de 2016 enfatiza a perda de complacência como uma causa, não como efeito da HAP. Também demonstra que a perda da complacência ocorre previamente à elevação da RVP, sendo, portanto, o parâmetro mais sensível para diagnóstico (THENAPPAN et al., 2016).

O VD trabalha sinergicamente com a circulação arterial pulmonar. Suas paredes livres são finas (no adulto a espessura varia de 3 a 5 mm), têm a forma triangular visto em secção lateral e em forma de crescente em secção transversal (SADEGHPOUR et al., 2016; SANZ et al., 2019). A outra parede é o septo interventricular, compartilhado com o VE. Quando

comparado ao VE, o VD possui cardiomiócitos 15% menores e 30% mais colágeno (SANZ et al., 2019). O suprimento sanguíneo é fornecido pela artéria coronária direita e ocorre tanto na diástole (como no VE) quanto na sístole, pois a pressão transmural sistólica normalmente fica abaixo da pressão da raiz aórtica (GREYSON, 2010). O metabolismo energético para produção de trifosfato de adenosina (ATP) provém principalmente da oxidação de ácidos graxos (SADEGHPOUR et al., 2016; SANZ et al., 2019).

O VD possui capacidade de acomodar um retorno venoso variável, que normalmente se equivale ao débito cardíaco (DC) (SANZ et al., 2019). Se o DC em repouso varia entre 4 e 6 L/min, a grande área de superfície pulmonar que acomoda esse volume para trocas gasosas precisa de uma bomba complacente, que comporta fluxos volumosos sob baixas pressões. Deste modo, o VD foi moldado evolutivamente para suportar altas pré-cargas (em níveis fisiológicos); entretanto, apesar de mecanismos de compensação, falha quando desafiado a trabalhar com altas pós-cargas (LAI et al., 2014).

## 1.4 Fisiopatologia da Hipertensão Arterial Pulmonar

### 1.4.1 Alterações na Circulação Pulmonar na Hipertensão Arterial Pulmonar

Histologicamente, as pequenas artérias e arteríolas possuem 3 camadas bem definidas: a íntima, composta de células endoteliais vasculares; a média, composta de células musculares lisas; a adventícia, composta de fibras de colágenos I e III, elastinas, fibronectina, fibroblastos, poucos macrófagos e mastócitos e células progenitoras residentes (SYSOL et al., 2018).

As células endoteliais vasculares, em sua normalidade, regulam o tônus das células musculares lisas e expressam moléculas de adesão intercelular, moléculas antiproliferativas e antitrombóticas. Entretanto, na HAP, tornam-se disfuncionais por mecanismos ainda sob investigação, como toxinas, espécies reativas de oxigênio, estresse de parede por fluxo sanguíneo não laminar, hipóxia (MONTANI et al., 2013; SYSOL et al., 2018).

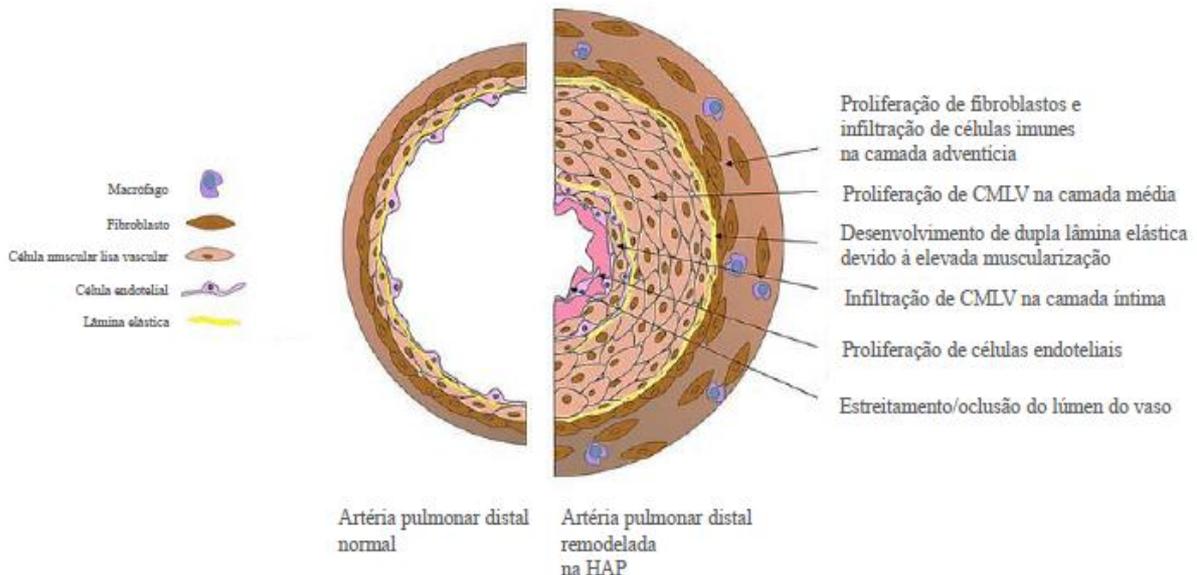
Com relação à regulação do tônus vascular, há menor produção de NO pela diminuição da expressão ou pelo desacoplamento da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e/ou pela menor disponibilidade de NO pela reação dessa molécula com espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Também há menor produção de  $PGI_2$  e um desvio do ácido araquidônico para maior formação de  $TXA_2$ . A ET-1, produzida pelas células endoteliais, sofre superexpressão nas células endoteliais disfuncionais (LAN et al., 2018; MALENFANT et al., 2013; MORRELL et al., 2009; SYSOL et al., 2018).

Células endoteliais disfuncionais também podem mudar de fenótipo para um tipo mesenquimal. Há perda da expressão de moléculas de adesão célula-célula – como caderina endotelial vascular (VE-caderina) e molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1) – e aumento da expressão de metaloproteinases (MMP), principalmente as que degradam colágeno tipo IV (MMP-2 e MMP-9). Ainda, há expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso e produção e deposição de colágeno tipo I e de elastinas. Desta forma, essas células adquirem capacidade de remodelar a matriz extracelular (MEC) da camada íntima e, após migração, também da camada média (STENMARK et al., 2016; THENAPPAN et al., 2018) (Figura 1).

A degradação da MEC possibilita a liberação e ativação de fatores de crescimento e fatores quimiotáticos antes estocados na forma inativa. Entre os fatores liberados estão o fator

de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2) e o fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Os dois últimos mudam o fenótipo das células musculares lisas provocando hipertrofia, hiperplasia e expressão e liberação da elastase vascular endógena (EVE), que degrada a lâmina elástica interna. FGF-2 e TGF- $\beta$  também induzem a superexpressão e liberação da glicoproteína tenascina C (TN-C) pelas células musculares lisas que, em conjunto com FGF-2, amplifica a resposta proliferativa. Desta forma, as células musculares lisas se tornam aptas a adentrar a camada íntima e, conjuntamente com as células endoteliais, a proliferar formando uma nova camada, a neointima, a qual diminui o raio da luz arterial (CHELLADURAI et al., 2012; RABINOVITCH, 1998; THENAPPAN et al., 2018) (Figura 1).

Figura 1 – Remodelamento das pequenas artérias e arteríolas pulmonares



Fonte: [https://www.researchgate.net/figure/Pulmonary-vascular-remodelling-in-PAH-Diagram-shows-a-small-pulmonary-artery-in\\_fig2\\_338119855](https://www.researchgate.net/figure/Pulmonary-vascular-remodelling-in-PAH-Diagram-shows-a-small-pulmonary-artery-in_fig2_338119855). Modificado pelo autor.

Nas células musculares lisas, a vasoconstrição sustentada é resultado tanto da escassez de NO e PGI<sub>2</sub> quanto do aumento de TXA<sub>2</sub> e ET-1 (Figura 2). Ainda, as células musculares lisas superexpressam o receptor de ET-1, ETAR, o qual é responsável por levar, também, à vasoconstrição. Além da vasoconstrição, as células musculares lisas sofrem hipertrofia, hiperplasia e se tornam resistentes à apoptose. O NO e a PGI<sub>2</sub>, além de suas propriedades sobre o tônus muscular, inibem a proliferação, enquanto que o TXA<sub>2</sub> a estimula (Figura 2). Já a ativação do ETAR pela ET-1 sinaliza para a hipertrofia e hiperplasia (Figura 2). Deste modo, a camada média vai sendo remodelada, sofrendo muscularização e aumentando sua espessura. Finalmente, a soma de vasoconstrição e muscularização faz com que o raio de



et al., 2007). Entretanto, na hipertensão pulmonar, apesar do modelo “*inside-out*” ser o mais estudado, há discussões sobre a possibilidade das alterações arteriais também se originarem na camada adventícia, propagando-se para a camada média e sucessivamente para a íntima, de uma maneira “*outside-in*” (SPIEKERKOETTER et al., 2019; STENMARK et al., 2011; STENMARK et al., 2012). Em modelos de hipertensão pulmonar, principalmente na indução por hipóxia, mas também na indução por monocrotalina, a camada adventícia parece sofrer as alterações mais precoces (BELKNAP et al., 1997; MEYRICK et al., 1979; ROSE et al., 2002). Independente do modelo, a camada adventícia sofre alterações evidentes. Fibroblastos quiescentes participam do *turnover* das fibras de colágeno da MEC da adventícia, sendo sensíveis a sinais ambientais, por expressarem vários receptores de membrana: de citocinas (PDGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, Angiotensina II e ET-1), receptores de danos como os do tipo Toll (TLRs) e os do tipo NOD (NLRs), receptores para produtos de glicação avançada (RAGEs) e receptores de interação com a MEC (Integrinas) (STENMARK et al., 2011; STENMARK et al., 2012). Quando ativados, assim como em outros tecidos, na tentativa de reparar danos, proliferam e mudam a expressão gênica, superexpressando e liberando componentes da MEC (colágenos fibrilares I e III) e fibronectina, assim como metaloproteinases (MMP-9). Portanto, fibroblastos ativados têm aptidão de remodelar a túnica adventícia, causar fibrose, espessamento e enrijecimento da mesma. Ainda, alguns fibroblastos podem expressar  $\alpha$ -actina de músculo liso, o que os caracteriza como miofibroblastos, fornecendo características contráteis e migratórias (DARBY et al., 2007) (Figura 1).

Portanto, a perda de complacência das pequenas artérias e arteríolas pulmonares tem como fatores responsáveis a inflamação persistente, a vasoconstrição sustentada de células musculares lisas e de células que expressam  $\alpha$ -actina de músculo liso e o remodelamento fibrótico da MEC nas três camadas vasculares.

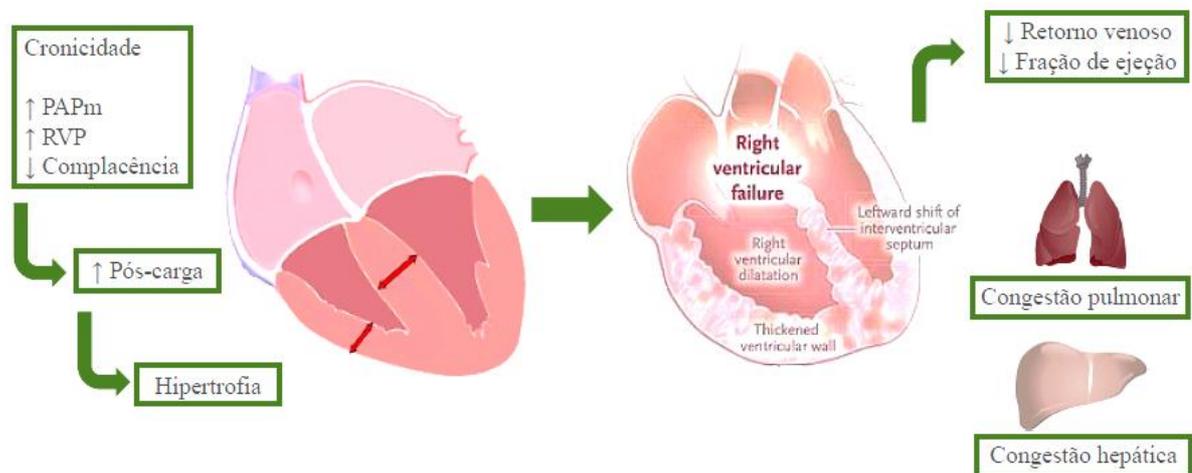
#### 1.4.2 Alterações no Ventrículo Direito na Hipertensão Arterial Pulmonar

O aumento progressivo da pós-carga leva o VD a ativar mecanismos adaptativos. A sobrecarga de pressão inicialmente leva à hipertrofia adaptativa dos cardiomiócitos (SANZ et al., 2019). Essa hipertrofia é concêntrica, apresenta pouca dilatação e pouca rigidez fibrótica

da câmara, preservando, assim, a função diastólica, sistólica e o DC (BRUGGEN et al., 2017; RYAN et al., 2015; SANZ et al., 2019) (Figura 3).

O limiar e os mecanismos que transformam a hipertrofia adaptativa em função ventricular direita descompensada e insuficiência cardíaca direita ainda estão sob investigação. Alguns dos mecanismos que parecem levar à descompensação são: isquemia das fibras musculares devido ao aumento de pressão transmural que diminui a perfusão da artéria coronária direita e rarefação de capilares devido à diminuição da angiogênese; mudança do perfil metabólico de produção de ATP pela glicólise anaeróbica, menos eficiente na produção de ATP para a contração muscular; dessensibilização de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, diminuindo o inotropismo; reprogramação da expressão gênica para um padrão fetal, com a troca da cadeia pesada da miosina de  $\alpha$  para  $\beta$  (BRUGGEN et al., 2017; RYAN et al., 2015; SANZ et al., 2019). O VD com função descompensada apresenta hipertrofia excêntrica, encontra-se dilatado e com paredes rígidas, resultando no aumento do volume diastólico final (VDF), diminuição da fração de ejeção e diminuição do DC (BRUGGEN et al., 2017; RYAN et al., 2015) (Figura 3).

Figura 3 - Evolução das alterações do ventrículo direito na hipertensão arterial pulmonar



Legenda: PAPm: pressão arterial pulmonar média; RVP: resistência vascular pulmonar. Fonte: <https://en.myeckg.com/hypertrophy-dilation/right-ventricular-hypertrophy.html> e HOUSTON, Brian A.; BRITAIN, Evan L.; TEDFORD, Ryan J. Right Ventricular Failure. *The New England Journal of Medicine*, v. 388, n. 12, p. 1111–1125, mar. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMra2207410>. Modificado pelo autor.

## 1.5 O Estresse Oxidativo

### 1.5.1 Conceito de Estresse Oxidativo

Desde o momento da escala evolutiva no qual os organismos passaram a utilizar o oxigênio de forma vantajosa, principalmente na respiração aeróbia para produção de grandes quantidades de ATP, foram selecionados aqueles que possuíam defesas contra os danos causados pelas reações de oxirredução.

É importante ressaltar que EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), quando produzidas em níveis moderados e controlados, são essenciais na sinalização celular de proliferação, crescimento, diferenciação, controle do tônus vascular, inflamação e apoptose. Portanto, o estresse oxidativo é o termo empregado para designar o desequilíbrio na homeostase redox celular. Pode ocorrer tanto pelo aumento na produção de EROs e ERNs quanto pela diminuição das defesas celulares enzimáticas e não enzimáticas (VALKO et al., 2007).

EROs são moléculas altamente reativas e podem ser radicais (como o próprio  $O_2$ , o superóxido  $O_2^{\bullet-}$ , o hidroxil  $\bullet OH$  e o peroxil  $ROO^{\bullet}$ ) ou substâncias não-radicalares como o peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$  e o ácido hipocloroso (HOCl). ERNs são moléculas como o radical óxido nítrico  $\bullet NO$  e seu produto de reação com o  $O_2^{\bullet-}$ , o ânion altamente reativo peroxinitrito  $ONOO^-$  (VALKO et al., 2007).

### 1.5.2 Fontes de Espécies Reativas de Oxigênio e Espécies Reativas de Nitrogênio e Sistemas Antioxidantes Enzimáticos

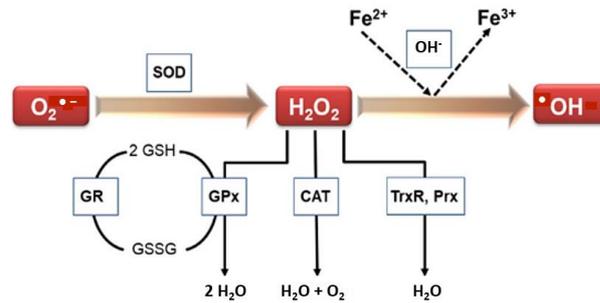
O  $O_2^{\bullet-}$  pode ser produzido nos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, através do “vazamento” de elétrons para o  $O_2$  disponível na matriz. Em níveis fisiológicos, menos de 0,2% do  $O_2$  na mitocôndria sofre redução a  $O_2^{\bullet-}$  (RADI, 2018). Entretanto, a enzima superóxido dismutase 2 (SOD2 ou MnSOD), presente na matriz mitocondrial, catalisa a dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$  (Figura 4). Deste modo, o  $O_2^{\bullet-}$  é neutralizado e, se as membranas interna e externa estiverem intactas, as moléculas de  $O_2^{\bullet-}$  não

possuem propriedades para se difundir para fora da mitocôndria (RADI, 2018; VALKO et al., 2007). No metabolismo das purinas, a enzima xantina oxidase (XO) catalisa a hidroxilação oxidativa transformando hipoxantina em xantina e esta em ácido úrico, produzindo também  $O_2^{\bullet-}$  (RADI, 2018; VALKO et al., 2007). Outras enzimas produtoras de  $O_2^{\bullet-}$  são as NADPH oxidases (NOX), uma família com várias isoformas encontradas em neutrófilos, macrófagos, assim como em outros tipos celulares, como as células endoteliais vasculares. Essas enzimas catalisam a redução do  $O_2$  em  $O_2^{\bullet-}$  às custas de equivalentes redutores como o dinucleotídeo de nicotinamida adenina reduzido (NADPH). O  $O_2^{\bullet-}$  gerado pelas XO e NOX pode ser neutralizado pela SOD1 ou CuZnSOD, presente no espaço intermembrana e no citoplasma, produzindo  $H_2O_2$  e  $O_2$  (AFANAS'EV, 2011; RADI, 2018; VALKO et al., 2007) (Figura 4).

Com relação às ERNs, temos a produção de  $\bullet NO$  pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS). O NO é capaz de se difundir pelo citoplasma e por membranas celulares e é uma molécula sinalizadora importante para regular o tônus vascular propiciando vasodilatação, é neurotransmissor, e regulador do sistema imune. Porém, quando reage com grandes quantidades de  $O_2^{\bullet-}$ , forma um poderoso agente oxidante, o  $ONOO^-$  (VALKO et al., 2007).

O  $H_2O_2$ , produzido pelas SODs ou liberado de peroxissomos disfuncionais, deve ser cuidadosamente removido do meio celular. Uma das enzimas responsáveis pela sua remoção é a catalase (CAT), a qual decompõe duas moléculas de  $H_2O_2$  em duas moléculas de  $H_2O$  e uma molécula de  $O_2$  (Figura 4). Outra enzima que atua sobre o  $H_2O_2$  é a glutatona peroxidase (GPx), que utiliza duas moléculas de glutatona reduzida (2 GSH) como equivalentes redutores para transformar o  $H_2O_2$  em duas moléculas de  $H_2O$  e uma molécula de glutatona oxidada (GSSG) (RADI, 2018; VALKO et al., 2007) (Figura 4). O  $H_2O_2$  em excesso, encontrando metais de transição como ferro ou cobre, pode formar o radical hidroxil,  $\bullet OH$  – que é extremamente reativo – através da Reação de Fenton. Essa reação envolve a oxidação do  $Fe^{2+}$  em  $Fe^{3+}$  com o  $H_2O_2$  como agente oxidante e formação de  $OH^-$  e  $\bullet OH$  (Figura 4). Em situação fisiológica normal, moléculas de  $Fe^{2+}$  não são encontradas livres, mas sim, ligadas a proteínas, fazendo parte do sítio catalítico ou sequestradas em proteínas transportadoras ou de armazenamento como transferrina e ferritina. Entretanto, em situações de estresse oxidativo, o superóxido pode forçar a liberação de  $Fe^{2+}$  das proteínas (VALKO et al., 2007) (Figura 4).

Figura 4 – Sistema antioxidante enzimático



Legenda: SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; GPx: glutatona peroxidase; GR: glutatona redutase; TrxR: tioredoxina redutase; Prx: peroxiredoxina. Fonte: LEE, Seung Eun; YONG, Seek Park. The Emerging Roles of Antioxidant Enzymes by Dietary Phytochemicals in Vascular Diseases. *Life*, v. 11, no. 3, p. 199, mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/life11030199>. Modificado pelo autor.

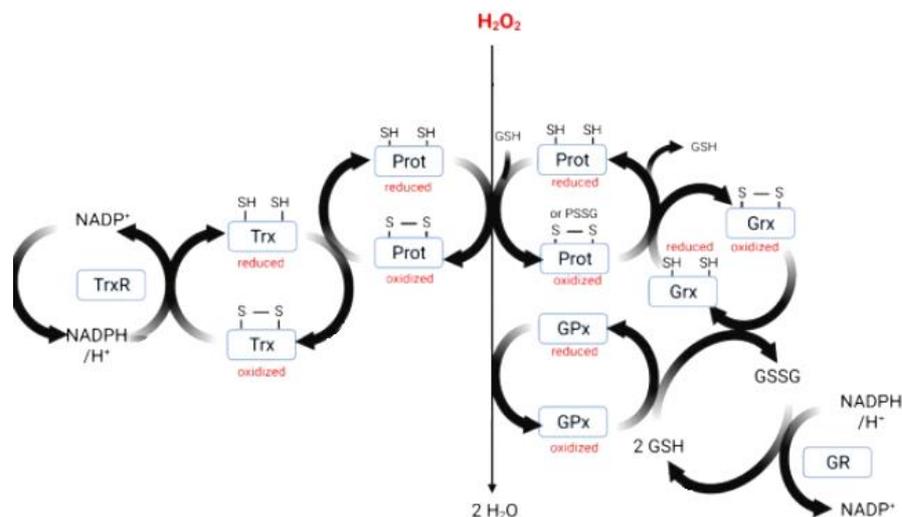
### 1.5.3 Sistemas Antioxidantes Não-Enzimáticos e Sulfidrilas

Compõem os sistemas de defesa antioxidante não-enzimáticos moléculas estruturalmente diversas, podendo ser endógenas ou exógenas, hidrofílicas ou lipofílicas. Entre as principais moléculas endógenas, destaca-se a GSH. Já dentre as moléculas exógenas, adquiridas via alimentação, destacam-se vitamina C (ácido ascórbico) e vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) (MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA et al., 2018).

A GSH, antioxidante hidrofílico, atua em várias rotas de proteção contra danos oxidativos. É doadora de equivalentes redutores ( $H^+$ ) devido ao grupamento sulfidrilas (-SH) e, oxidada ( $GS^-$ ), pode se ligar com outra molécula GSH através de pontes dissulfeto (GSSG) (FORMAN et al., 2009; MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA et al., 2018). É utilizada pela GPx e pela peroxiredoxina 6 (Prx 6), as quais reduzem  $H_2O_2$  a  $H_2O$  (FORMAN et al., 2009). Também auxilia a reconstituição das formas reduzidas das vitaminas C e E, que agem contra a lipoperoxidação (MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA et al., 2018). A GSH pode formar ligações dissulfeto com grupos tiolato ( $-S^-$ ) de proteínas oxidadas, gerando um dissulfeto misto (PSSG) e protegendo a integridade proteica da oxidação. A adição da GSH em uma proteína pode ser uma forma de modificação pós-traducional reversível, denominada S-glutationilação e, além da função antioxidante, compõe parte da sinalização celular (THOMAS et al., 2001).

Sulfidrilas são proteínas ou outras moléculas de baixo peso molecular que possuem grupamentos tíois (-SH) em suas estruturas. Nas proteínas, através dos resíduos do aminoácido cisteína, participam nos domínios de ligação ao DNA, na estabilização da estrutura terciária e/ou quaternária, na formação do sítio catalítico de enzimas, nas ligações coordenadas com íons metálicos, na sinalização celular redox e nas defesas antioxidantes (THOMAS et al., 2001). Os resíduos de cisteína podem sofrer diversas modificações oxidativas, podendo ser reversíveis ou irreversíveis. Entre as reversíveis – muitas das quais modificações pós-traducionais – estão a formação de ligações dissulfeto intra ou intermoleculares, a S-glutationilação (-GSH), a S-nitrosilação (-SNO) e a formação de ácido sulfênico (-SOH). As modificações reversíveis são parte do sistema de sinalização celular redox-sensível e estão presentes nos processos de apoptose, proliferação celular e diferenciação. Portanto, a reversibilidade é necessária e garantida através da atividade de enzimas como as tioredoxinas (Trx), tioredoxina redutase (TrxR), as glutaredoxinas (Grx), glutatona redutase (GR) (Figura 5) e as peroxiredoxinas (Prx) (HANSCHMANN et al., 2013). As Trx reduzem ligações dissulfeto proteicas (Figura 5), removem moléculas de glutatona adicionadas aos resíduos de cisteína (desglutationilação) e são regeneradas à sua forma reduzida pela TrxR, às custas de NADPH (Figura 5). As Grx, além de reduzirem ligações dissulfeto, também catalisam a desglutationilação (Figura 5). As Grx retornam à sua forma reduzida pela ação da GR, às custas de GSH e NADPH (HANSCHMANN et al., 2013) (Figura 5). Já entre as modificações irreversíveis estão a formação de ácido sulfínico (-SO<sub>2</sub>H) e ácido sulfônico (-SO<sub>3</sub>H) (HANSCHMANN et al., 2013; THOMAS et al., 2001).

Figura 5 – Sistema antioxidante baseado em sulfidrilas



Legenda: NADPH: dinucleotídeo de nicotinamida adenina reduzido; GSH: glutathiona reduzida; GSSG: glutathiona oxidada; TrxR: tioredoxina redutase; Trx: tioredoxina; Prot: proteína; GPx: glutathiona peroxidase; GR: glutathiona redutase; Grx: glutaredoxina. Fonte: Andreadou, Ioanna et al. Thiol-based redox-active proteins as cardioprotective therapeutic agents in cardiovascular diseases. *Basic Research in Cardiology*, 116(1):44, jul. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00395-021-00885-5>. Modificado pelo autor.

Ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol possuem importante função na prevenção e no reparo da oxidação dos fosfolípídeos de membrana, os quais contem ácidos graxos poli-insaturados. As ligações duplas entre carbonos podem ser atacadas por  $\bullet\text{OH}$ , produzindo  $\text{H}_2\text{O}$  e um radical lipídico ( $\text{L}\bullet$ ). Este radical, reagindo com  $\text{O}_2$ , formará um radical peroxil derivado de lipídeo ( $\text{LOO}\bullet$ ). Ao atacar a ligação dupla de outro fosfolípídeo,  $\text{LOO}\bullet$  se transformará em hidroperóxido lipídico ( $\text{LOOH}$ ) e gerará outro  $\text{L}\bullet$ , que por sua vez iniciará novo ciclo. Para proteger e/ou interromper esta reação em cadeia de oxidação dos fosfolípídeos de membrana,  $\alpha$ -tocoferol pode doar  $\text{H}^+$  para o  $\text{LOO}\bullet$ , formado  $\text{LOOH}$ , sem a produção de um novo  $\text{L}\bullet$ . Para reciclar o  $\alpha$ -tocoferol oxidado, um  $\text{H}^+$  pode ser transferido do ácido ascórbico, o qual se transforma em dehidroascorbato.

## 1.6 Modelo de Indução da Hipertensão Arterial Pulmonar por Monocrotalina

### 1.6.1 Intoxicação por Alcaloides Pirrolizidínicos

Alcaloides pirrolizidínicos são metabólitos produzidos por vegetais para fins de proteção contra animais herbívoros. Identificam-se mais de 500, distribuídos em mais de 6000 espécies de plantas (DUSEMUND, 2018). A intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos é relatada em animais e em humanos, com registros de surtos na China, Índia, Afeganistão, Paquistão, África e Jamaica. É adquirida, principalmente, pela ingestão de alimentos de origem vegetal e animal como grãos, vários tipos de chás, mel e leite contaminados (DUSEMUND, 2018). A intoxicação aguda causa necrose hemorrágica hepática, enquanto que a exposição crônica causa megalocitose hepatocelular, cirrose e doenças veno-oclusivas que resultam em hipertensão portal e insuficiência hepática (DUSEMUND, 2018; HUXTABLE, 1990; WILSON et al., 1992).

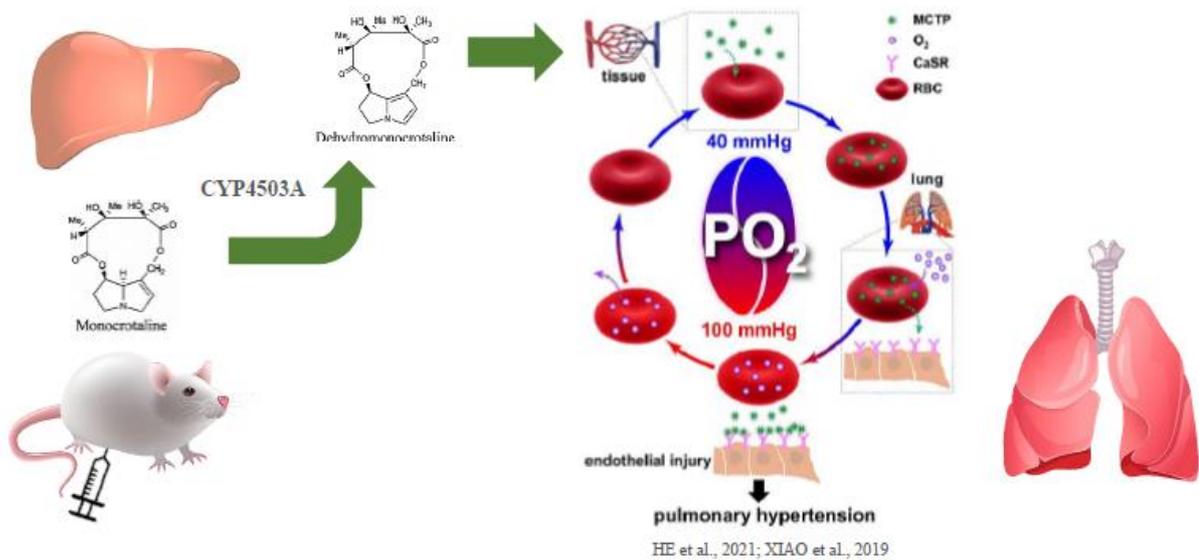
### 1.6.2 Monocrotalina

A monocrotalina (MCT) é um alcaloide pirrolizidínico macrocíclico de 11 membros encontrado nas folhas, tronco e sementes de plantas do gênero *Crotalaria*, principalmente na espécie *Crotalaria spectabilis* (GOMEZ-ARROYO et al., 2012; HUXTABLE, 1990; NOGUEIRA-FERREIRA et al., 2015; WILSON et al., 1992).

A metabolização é essencialmente hepática, através do sistema microsomal do citocromo P-450 (CYP450), isoenzima CYP3A4, gerando o derivado pirrólico dehidromonocrotalina (MCTP) na fase 1 (Figura 6) (GOMEZ-ARROYO et al., 2012; HE et al., 2021). A MCTP é muito reativa e instável no plasma, com tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de 3 a 5 segundos (GOMEZ-ARROYO et al., 2012; HUXTABLE et al., 1996; NOGUEIRA-FERREIRA et al., 2015). Portanto, sua estabilização e transporte até os pulmões são efetuados através de adutos, principalmente com a hemoglobina (Hb) dos eritrócitos e, em menor extensão, com a albumina e outras proteínas plasmáticas (HE et al., 2021; XIAO et al., 2019). A MCTP se complexa com a Hb dos eritrócitos em pressões parciais de oxigênio

( $PO_2$ ) baixas, como 40 mmHg, e é liberada do grupo heme em  $PO_2$  altas, como 100 mmHg. Este fato explica a especificidade da MCTP pelo tecido pulmonar, especialmente na adesão e acumulação nas células endoteliais dos capilares e arteríolas pré-capilares (XIAO et al., 2019) (Figura 6).

Figura 6 – Farmacocinética e farmacodinâmica do modelo de indução da hipertensão arterial pulmonar pela monocrotalina



Legenda: mmHg: milímetros de mercúrio; MCTP: dehidromonocrotalina; CaSR: receptor de cálcio; RBC: células vermelhas sanguíneas. Fonte: HE et al., 2021; XIAO et al., 2019. Modificado pelo autor.

### 1.6.3 Modelo de Hipertensão Arterial Pulmonar

A indução da HAP por MCT tem sido um dos modelos mais utilizados por pesquisadores em todo o mundo, levando a avanços na compreensão dos processos fisiopatológicos subjacentes à doença (GOMEZ-ARROYO et al., 2012; MAARMAN et al., 2013).

Na literatura existem estudos utilizando diferentes espécies de animais, diferentes raças, diferentes vias de administração e diferentes dosagens de MCT (GOMEZ-ARROYO et al., 2012; LACHANT et al., 2018). Em ratos, doses elevadas (acima de 100 mg/Kg) estão relacionadas ao desenvolvimento de doença hepática veno-oclusiva e dano pulmonar agudo, levando os animais ao óbito precocemente (GOMEZ-ARROYO et al., 2012; LACHANT et

al., 2018). Doses baixas (abaixo de 30 mg/Kg) podem não levar ao desenvolvimento da HAP (KAKUSAKA et al., 1989). Uma única exposição com doses de 50 a 60 mg/Kg por via intraperitoneal ou subcutânea, está ligada à pneumotoxicidade sem dano hepático (LACHANT et al., 2018). É relevante frisar que, na maioria dos estudos, são utilizados animais machos visto que as fêmeas apresentam resistência em desenvolver HAP induzida por MCT (LACHANT et al., 2018).

Os objetivos do modelo são o estudo e a compreensão da sinalização celular, das alterações vasculares pulmonares, das alterações hemodinâmicas e dos mecanismos compensatórios fisiológicos cardíacos. Portanto, é necessária uma dosagem que proporcione tempo para a detecção das alterações e, principalmente, que possibilite traçar uma linha temporal evidenciando as alterações precoces e tardias.

#### 1.6.4 Alterações Temporais Causadas por Monocrotalina

##### *1.6.4.1 Alterações Pulmonares*

7 dias após indução da HAP por administração de MCT, cortes histológicos de pulmão mostram infiltrado inflamatório perivascular (FAN et al., 2021; ZIMMER et al., 2021), sendo preponderante a presença de macrófagos do tipo M1 (CHAO et al., 2021; FAN et al., 2021). Nesta fase predomina a inflamação aguda, com altos níveis de fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (CHAO et al., 2021), assim como interleucina 12 (IL-12) (FAN et al., 2021).

Após 14 dias, já é possível presenciar sinais de remodelamento vascular, com leve hipertrofia e fibrose (CHAO et al., 2021; ZIMMER et al., 2021). O perfil inflamatório começa a mudar em direção à inflamação crônica, pois, apesar dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  permanecerem elevados, há presença de macrófagos M2 e aumento nos níveis de interleucina 6 (IL-6) (CHAO et al., 2021; FAN et al., 2021).

Após 21 dias, o remodelamento vascular é significativo, com espessamento da camada média e muscularização (FAN et al., 2021; ZIMMER et al., 2021), assim como alterações de MEC, com aumento do conteúdo de colágeno e fibrose (ZIMMER et al., 2021). Os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se elevam. Entretanto, a inflamação possui perfil crônico, visto que os

macrófagos M2 são preponderantes e se detecta aumento nos níveis de IL-6 e interleucina 10 (IL-10) (CHAO et al., 2021; FAN et al., 2021).

A reatividade vascular da artéria pulmonar se altera após 14 e 21 dias. Seguido da contração induzida pela substância agonista  $\alpha$ -adrenérgica fenilefrina, o relaxamento induzido por acetilcolina e mediado pela liberação endotelial de NO é reduzido (ZIMMER et al., 2021).

Como consequência do remodelamento vascular constritivo, a PAPm se eleva significativamente após 14 dias (ZIMMER et al., 2021) e atinge níveis críticos após 21 dias (CHAO et al., 2021; FAN et al., 2021; ZIMMER et al., 2021).

#### *1.6.4.2 Alterações Cardíacas do Ventrículo Direito*

Após 7 dias da indução da HAP por administração de MCT, os cortes histológicos do VD demonstram leve infiltração de células inflamatórias entre alguns cardiomiócitos. As análises bioquímicas relacionadas ao estresse oxidativo indicam níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentados, níveis de sulfidrilas reduzidos e aumento na lipoperoxidação. Ainda, há aumento da atividade da enzima CAT. Portanto, o VD apresenta sinais de estresse oxidativo (ZIMMER et al., 2020). Funcionalmente, através de análises de ecocardiografia, o VD apresenta fluxo arterial pulmonar normal, medido pela razão entre o tempo de aceleração e o tempo de ejeção (AT/ET) (ZIMMER et al., 2020). Entretanto, outro estudo demonstra uma AT/ET já reduzida no mesmo intervalo de tempo (LEICHSENRING – SILVA et al., 2011). Brevemente, AT/ET é um parâmetro de RVP, que mede o tempo de aceleração do fluxo sanguíneo na saída do VD (AT) em relação ao tempo de ejeção total (ET). Na HAP, a velocidade máxima do fluxo para a tronco pulmonar é atingida mais rapidamente, pois o VD contrai mais fortemente para vencer a maior RVP. Também em função da maior RVP, o VD passa mais tempo tentando vencer a resistência à ejeção. Assim, no geral, AT é menor, ET é maior e a razão AT/ET diminui.

Após 14 dias, a histologia do VD ainda apresenta leve presença de infiltrado inflamatório. O estresse oxidativo mostra-se compensado, pois os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduzem e os níveis de sulfidrilas aumentam (ZIMMER et al., 2020). As análises morfométricas demonstram hipertrofia do VD (ZIMMER et al., 2020; ZIMMER et al., 2021), porém sem sinais de congestão pulmonar ou hepática (ZIMMER et al., 2020). A análise hemodinâmica

apresenta elevação na pressão sistólica do VD (PSVD) (ZIMMER et al., 2020), enquanto que a ecocardiografia indica AT/ET progressivamente reduzida (LEICHSENRING – SILVA et al., 2011). Digno de nota, a hipertrofia do VD, a elevação da PSVD e uma AT/ET mais reduzida coincidem com o aumento na PAPm verificada após 14 dias. Sem a presença de congestão pulmonar e hepática, conclui-se que o VD apresenta hipertrofia compensatória e função minimamente preservada.

Após 21 dias, os cortes histológicos do VD mostram alteração, com presença moderada de infiltrado de células inflamatórias. O estresse oxidativo descompensa, com aumento da lipoperoxidação, diminuição da atividade da enzima SOD e aumento da atividade da enzima GPx (ZIMMER et al., 2020). A progressiva hipertrofia do VD (CHAO et al., 2021; FAN et al., 2021; LEICHSENRING – SILVA et al., 2011; ZIMMER et al., 2020; ZIMMER et al., 2021) é acompanhada pela congestão pulmonar e hepática (LEICHSENRING – SILVA et al., 2011; ZIMMER et al., 2020). A PSVD apresenta elevação progressivamente maior (FAN et al., 2021; ZIMMER et al., 2020) e é detectado aumento na pressão diastólica final do VD (PDFVD) (ZIMMER et al., 2020). Os dados ecocardiográficos demonstram disfunção diastólica, com redução da razão entre enchimento rápido e o enchimento lento (E/A) e aumento do diâmetro diastólico do VD (DDVD) (ZIMMER et al., 2020). A razão E/A é um parâmetro diastólico que mede a razão entre a velocidade máxima de enchimento rápido (“E”, dependente do gradiente de pressão entre o átrio direito (AD) e o VD) pela velocidade máxima de enchimento lento (“A”, dependente da contração atrial). O VD hipertrofiado e fibrótico relaxa menos e aumenta a pressão interna, resultando em menor velocidade do fluxo de sangue que flui do AD para o VD, diminuindo “E”. Para compensar, o AD contrai mais fortemente e aumenta a velocidade do fluxo de sangue para o VD, aumentando “A”. Portanto, a razão E/A diminui. O DDVD se mostra maior pois o VD se encontra dilatado pela sobrecarga de volume. Em relação às alterações sistólicas, detecta-se redução progressiva de AT/ET e redução da excursão sistólica do plano anular da tricúspide (TAPSE) (ZIMMER et al., 2020). A TAPSE é um parâmetro sistólico que mede a movimentação do anel da tricúspide em direção ao ápice durante a sístole do VD. Seja pela hipertrofia considerável ou pela fibrose que a acompanha, o VD não consegue gerar uma contração efetiva para compensar as elevadas pós-cargas. Assim, a TAPSE diminui. A congestão pulmonar e hepática resultam da função ventricular direita insuficiente, a qual não compensa as PAPm extremas detectadas após 21 dias, insuficiência reforçada pelos dados hemodinâmicos e ecocardiográficos.

## 1.7 Músculo Estriado Esquelético e Hipertensão Arterial Pulmonar

A musculatura estriada esquelética é responsável por aproximadamente 40% do peso corporal total (FRONTERA et al., 2015) e, em repouso, consome 30% do O<sub>2</sub> (MARRA et al., 2015). Sua função vai além da óbvia contração geradora de movimento. Participa da manutenção da glicemia, captando glicose ou liberando substratos energéticos como aminoácidos e lactato.

Tradicionalmente, as fibras musculares esqueléticas são classificadas como tipo I ou tipo II. O tipo I produz ATP pela fosforilação oxidativa mitocondrial, sua velocidade de contração é mais lenta e, portanto, é mais resistente à fadiga. Assim, este tipo necessita de suprimento vascular extenso e grande quantidade de mitocôndrias. Já o tipo II produz ATP pela glicólise anaeróbica, a velocidade de contração é mais rápida e, assim, a geração dos subprodutos H<sup>+</sup> e lactato limitam a função e levam à fadiga rapidamente (FRONTERA et al., 2015).

Na HAP, os pacientes apresentam intolerância ao exercício, fraqueza e a perda de massa muscular (caquexia) (MARRA et al., 2015). Conforme as limitações físicas, os pacientes são categorizados em 4 classes, de acordo com *World Health Organization Functional Class* (WHO-FC). WHO-FC I não apresentam limitações físicas; WHO-FC II são assintomáticos em repouso, mas sob atividades comuns apresentam dispneia, fadiga, dor torácica e quase síncope e pequena limitação sob atividade física; WHO-FC III são assintomáticos em repouso, mas sob as menores atividades comuns apresentam dispneia, fadiga, dor torácica e quase síncope e grande limitação sob atividade física; WHO-FC IV apresentam sintomas em repouso e piora sob qualquer atividade física, com sinais de insuficiência ventricular direita (LEVINE, 2021). A *New York Heart Association* (NYHA) possui outro escore, de 4 classes para insuficiência cardíaca, também utilizado para pacientes com HAP. Na Classe I estão pacientes que não apresentam fadiga excessiva, dispneia ou palpitações em atividades físicas comuns, sem limitações físicas; na Classe II estão indivíduos que apresentam fadiga, dispneia, palpitações ou angina em atividades físicas comuns, tendo limitação física leve; na Classe III estão pacientes que em repouso se sentem confortáveis, mas apresentam fadiga, dispneia, palpitações ou angina, apresentando limitação física moderada; na Classe IV estão indivíduos que sentem desconforto mesmo em repouso e qualquer atividade física exacerba os sintomas, apresentando limitação física grave.

Ao nível da musculatura esquelética, investigações começaram a focar na disfunção muscular como uma patologia em si, não como mera consequência da função cardiopulmonar debilitante. Há estudos que detectaram redução da angiogênese, alterações mitocondriais, mudanças de fibras tipo I para tipo II e uma teoria que explica as alterações musculares as quais muito se parecem à síndrome metabólica.

A teoria metabólica, proposta por Paulin e Michelakis, em publicação de 2014, coloca a supressão mitocondrial da oxidação da glicose como o principal evento que leva às modificações da sinalização *upstream* e *downstream* em células endoteliais e células musculares lisas das paredes arteriais pulmonares. No músculo esquelético, resistência à insulina e acúmulo de gotículas lipídicas nas fibras musculares são frequentemente encontradas. Pacientes com HAP apresentam níveis séricos elevados de insulina e de lipídeos. Ainda, verifica-se a expressão reduzida do receptor ativado por proliferadores de peroxissomos gama (PPAR $\gamma$ ), o qual regula a adipogênese e o metabolismo da glicose; e da apolipoproteína E, a qual auxilia na redução de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidadas circulantes. A redução da expressão de PPAR $\gamma$  e de apolipoproteína E está ligada à resistência à insulina e à síndrome metabólica (Paulin & Michelakis, 2014).

Em um artigo de 2014, realizado em pacientes classes II e III da WHO, a biópsia de quadríceps femoral apresentou menor área de secção transversal e maior proporção de fibras tipo II. Em relação às vias de sinalização que levam à síntese ou degradação proteica, fosfoinositídeo 3-cinase (PIP3K)/ proteína cinase B (AKT)/ forkhead box subclasse O3 (Foxo3) apresentaram fosforilação reduzida. Além disso, os níveis de mRNA da proteína-1 muscular RING-finger (MuRF-1) e de Atrogina-1 estavam aumentados. Foxo3, um fator de transcrição presente no núcleo, é responsável pela expressão de MuRF-1 e Atrogina-1, as quais são ubiquitina-ligases que levam à degradação proteica pelo sistema ubiquitina-proteossomo. A fosforilação e ativação da AKT leva à fosforilação de Foxo3, o que resulta em sua exportação do núcleo e inibição da expressão de MuRF-1 e Atrogina-1. No mesmo estudo, as mitofusinas 1 e 2 (Mfn1, Mfn2), as quais fazem parte do processo de fusão mitocondrial, se apresentaram com níveis diminuídos (BATT et al., 2014).

Em 2015 foi publicado um artigo sobre o proteoma do músculo esquelético de 8 pacientes classes funcionais II e III da NYHA. O proteoma revelou diminuição da expressão de proteínas relacionadas à fosforilação oxidativa como as do ciclo de Krebs (isocitrato-desidrogenase e  $\alpha$ -cetogluturato-desidrogenase) e de subunidades de proteínas da cadeia de transporte de elétrons dos complexos I, III e V. As biópsias do músculo vasto lateral de pacientes com HAP apresentaram proporção menor de fibras do tipo I e maior de fibras do

tipo II. Além disso, músculo dos pacientes tem aumento da atividade da lactato-desidrogenase (LDH) e diminuição da atividade da piruvato-desidrogenase (PDH). Esses dados corroboram os resultados do proteoma, indicando mudança no padrão metabólico da fosforilação oxidativa para a glicólise anaeróbia. Anomalias mitocondriais também foram detectadas, pois o músculo de pacientes continha menor quantidade de mitocôndrias e estas se apresentaram deformadas, edemaciadas e com perda de cristas (MALENFANT et al., 2015).

## **2 JUSTIFICATIVA**

Sabe-se que a HAP é uma doença progressiva e que o estresse oxidativo está envolvido na sua patogênese. Pacientes com HAP apresentam alterações na musculatura esquelética que limitam sua funcionalidade. Não há estudos que avaliem o estresse oxidativo em músculos esqueléticos ao longo da progressão da HAP. Desta forma, este estudo vem suprir esta lacuna na literatura científica.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliação temporal do estresse oxidativo nos músculos diafragma e gastrocnêmio em ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Induzir a hipertensão arterial pulmonar.

Avaliar a perda de massa muscular.

Avaliar parâmetros de estresse oxidativo muscular.

## 4 ARTIGO CIENTÍFICO

### ANÁLISE TEMPORAL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA

Rosalia Lempk Constantin<sup>1</sup>, Aleksandra Zimmer<sup>1,2,3</sup> ORCID: 0000-0001-9322-8511, Adriane Belló-Klein<sup>1</sup> ORCID: 0000-0002-8340-7759

1 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Fisiologia, Brasil, Rio Grande do Sul, Porto Alegre. E-mail do autor: rosalia.l.c88@gmail.com

2 Rhode Island Hospital

3 Universidade de Caxias do Sul, Brasil, Rio Grande do Sul, Caxias do Sul

**Resumo:** Intolerância ao exercício e fraqueza muscular são encontradas em pacientes e em modelos animais de indução à hipertensão arterial pulmonar (HAP). Como em humanos, animais doentes demonstram alterações na musculatura esquelética. Objetivou-se avaliar temporalmente o estresse oxidativo nos músculos diafragma e gastrocnêmio em ratos com HAP induzida por monocrotalina (MCT). Dividiu-se 48 ratos Wistar machos,  $\pm 180$  gramas, em grupos Controle (CTR) e MCT 7, 14 e 21 dias. Administrou-se única dose MCT via intraperitoneal (60 mg/Kg) para indução da HAP. Diafragma e gastrocnêmio foram coletados e pesados. Mediu-se níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), lipoperoxidação (TBARS), concentração de sulfidrilas e atividades das enzimas NADPH oxidase (NOX), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Gastrocnêmio demonstrou atrofia no MCT21. Atividade da NOX aumentou em todos os tempos medidos no diafragma e apenas no MCT21 no gastrocnêmio. Níveis de EROs aumentaram no MCT7 no gastrocnêmio. No 7º dia, aumentou TBARS nos animais MCT tanto no diafragma quanto no gastrocnêmio. No 21º dia, aumentou atividade da SOD em relação ao controle e demais tempos no diafragma e apenas no MCT7 no gastrocnêmio. Atividade da CAT reduziu nos MCT7 e MCT14, respectivamente no diafragma e gastrocnêmio. No 21º dia, aumentou atividade da GPx em relação ao controle no diafragma e MCT7 no gastrocnêmio; enquanto que esta reduziu nos MCT14 e MCT21 no gastrocnêmio. Conclui-se que o diafragma estava mais protegido da oxidação do que o gastrocnêmio, no qual o ambiente mais oxidativo pode ter contribuído para a perda de massa muscular.

**Palavras-chave:** hipertensão arterial pulmonar; monocrotalina; músculo esquelético; estresse oxidativo; atrofia muscular.

#### Introdução

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) pertence ao grupo I da classificação do *World Symposium on Pulmonary Hypertension* (WSPH) [1, 2, 3, 4, 5]. A patologia é relativamente rara mas sua cronicidade, impactos na qualidade de vida e alta mortalidade, apesar dos avanços terapêuticos, faz dela um campo de pesquisa que carece de maior investigação da comunidade científica. Os mecanismos fisiopatológicos incluem o remodelamento de pequenas artérias e arteríolas pulmonares [3, 5, 6], vasoconstrição sustentada [3, 5, 6], perda da complacência vascular [7] e a consequente elevação da pressão arterial pulmonar média (PAPm). O ventrículo direito (VD)

possui mecanismos de adaptação ao aumento crônico da pós-carga [8], mas a evolução para insuficiência cardíaca direita [8, 9] ocorre na grande maioria dos pacientes que, em média, tem sobrevida de 3 ou 4 anos [2, 3].

Os pacientes relatam sintomas de dispneia, fadiga e fraqueza muscular mesmo sob mínimos esforços. De fato, a intolerância ao exercício físico e queda na qualidade de vida são umas das principais marcas da HAP [10, 11]. É óbvio que a troca gasosa prejudicada devido à limitação do fluxo sanguíneo arterial pulmonar para os alvéolos, a sobrecarga do VD, a diminuição do retorno venoso e conseqüentemente a redução do débito cardíaco proporcionam limitações às atividades que demandam maior aporte de sangue oxigenado aos tecidos. Entretanto, também há indícios de disfunção ao nível do músculo estriado esquelético, sendo relatados na literatura a redução da angiogênese [12, 13], alterações estruturais mitocondriais [14], metabolismo energético apresentando perfil glicolítico [14], mudanças de fibras tipo I para tipo II [14, 15], redução da área de secção transversal muscular [15] e inclusões lipídicas [14].

Na literatura, muitas redes de sinalização celular se encontram alteradas em cada uma das condições supracitadas. Entretanto, pouco se sabe, neste contexto, o comportamento espaço-temporal de redes emergentes de sinalização como, por exemplo, aquelas envolvendo espécies reativas de oxigênio (EROs). EROs podem se encaixar no conceito de antagonismo pleiotrópico, ou seja, doses baixas ou fisiológicas são requeridas para a manutenção ou adaptação celular a determinados estímulos, enquanto que doses altas levam a danos em lipídeos, proteínas e DNA. Se uma célula é desafiada a estímulos aumentando níveis de EROs para se adaptar através de modulações de redes de sinalização, diz-se que está sob eustresse oxidativo. Porém níveis supra-fisiológicos de EROs levam a danos às estruturas celulares, fato denominado distresse oxidativo [16]. O estado estacionário das EROs se mantém através de enzimas produtoras, removedoras e/ou transformadoras. Entre as produtoras está a fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido (NADPH) oxidase (NOX), que reduz  $O_2$  em ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Já entre as removedoras/transformadoras estão a superóxido dismutase (SOD), a qual realiza a dismutação enzimática do  $O_2^{\bullet-}$  em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e  $O_2$ ; a catalase (CAT), que realiza a redução de  $H_2O_2$  em  $2 H_2O$  e  $O_2$ ; e a glutathiona peroxidase (GPx), a qual realiza a redução de  $H_2O_2$  e de hidroperóxidos orgânicos [16, 17, 18].

O  $O_2^{\bullet-}$ , por ter meia vida curta devido à dismutação espontânea ou enzimática, não parece ter características apropriadas para ser um segundo mensageiro. Ao contrário, pode oxidar fosfolipídeos de membrana próximos ao seu local de produção, assim como em proteínas de membrana. Porém, o  $H_2O_2$  possui características de maior estabilidade, difusão entre membranas e possibilidade de interações oxidativas com proteínas redox-sensíveis, principalmente com resíduos de cisteína disponíveis para tal finalidade. Muitas proteínas contém resíduos de cisteína estrategicamente inseridos na estrutura proteica para sofrerem oxidação ou redução, os grupamentos tióis (-SH). Essas modificações pós-traducionais as tornam responsivas ao estado redox e, deste modo, podem desencadear várias ações adaptativas na sinalização celular como ativação/inibição de cinases ou fosfatases, modificações em canais iônicos e ativação de fatores de transcrição [16, 17]. Para respostas temporais apropriadas, essas proteínas devem voltar aos seus estados reduzidos. Neste momento entram em cena antioxidantes não enzimáticos, como a glutathiona reduzida (GSH), e enzimas, como a GPx. Essas proteínas e outras moléculas de baixo peso molecular, contendo tióis, são coletivamente denominadas sulfidrilas e auxiliam na manutenção da reversibilidade da oxidação de proteínas redox-sensíveis [19, 20].

Os músculos diafragma e gastrocnêmio utilizados neste estudo são provenientes de ratos Wistar machos induzidos a HAP por MCT de outro trabalho [21]. No trabalho citado, o leitor poderá encontrar dados sobre as alterações temporais no 7º, no 14º e no 21º dia referentes às PAPm, à hipertrofia do VD, à congestão hepática e pulmonar e aos danos nitrosativos no pulmão. Assim, o leitor terá a certeza de que os ratos foram induzidos e desenvolveram HAP por MCT, apresentando a evolução das características clássicas da patologia ao longo do tempo. No pulmão, o estresse oxidativo foi significativo no 21º dia, contribuindo nos mecanismos de vasoconstrição e remodelamento das paredes arteriais [21]. Em relação VD, outro estudo demonstrou que no 7º e no 14º dia o estresse oxidativo contribuiu nos mecanismos inflamatórios e de hipertrofia ventricular [22].

Na HAP, as investigações se concentram no pulmão e no VD, como os parâmetros que medem o balanço redox e suas implicações na fisiopatologia do remodelamento vascular arterial pulmonar e na hipertrofia e insuficiência do VD. O músculo estriado esquelético de indivíduos com HAP apresenta alterações, mas onde o balanço redox se encaixa na modulação das redes de sinalização que levam à essas alterações? Ainda, qual o comportamento temporal do balanço redox, no músculo esquelético, ao longo da progressão da doença? Neste estudo, foram avaliadas algumas alterações temporais do estado redox da musculatura esquelética (diafragma e gastrocnêmio) dos animais induzidos à HAP por MCT.

## **Objetivo**

Avaliação temporal do estresse oxidativo nos músculos diafragma e gastrocnêmio em ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina.

## **Materiais e Métodos**

### **Animais**

Foram utilizados um total de 48 ratos Wistar machos, pesando  $180 \pm 5$  gramas (g). Todos os procedimentos experimentais foram submetidos à análise e aprovação pelo Conselho de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS, sob protocolo número 32151.

### **Grupos experimentais**

Os grupos experimentais foram divididos em 6: Controle (CTR) 7 dias, CTR 14 dias e CTR 21 dias; Monocrotalina (MCT) 7 dias, MCT 14 dias e MCT 21 dias. Cada um dos 6 grupos continha 4 animais. Os ratos foram mantidos a 22°C, com ciclo de 12 horas claro/escuro e tiveram acesso à água e à ração peletizada *ad libitum*.

### **Indução da HAP**

A monocrotalina (Sigma – Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) foi administrada aos grupos MCT em dose única de 60 miligramas por quilograma (mg/Kg) de peso corporal, por via intraperitoneal. Já os grupos CTR receberam mesmo volume de solução salina 0.9%, pela mesma via de administração.

### **Peso corporal final e peso dos músculos**

Os ratos foram pesados a cada 3 dias para observação do ganho de peso e obtenção do peso corporal final. Após a limpeza dos tecidos, os músculos foram pesados em uma balança de precisão.

### **Eutanásia**

Ao final de 7, 14 e 21 dias, os animais foram anestesiados com ketamina (dose de 90 mg/Kg) e xilazina (dose de 10 mg/Kg) por via intraperitoneal. Após a sobrecarga anestésica, seguiu-se a decapitação por guilhotina.

### **Coleta de amostras**

Os músculos diafragma e gastrocnêmio foram coletados, limpos em solução de cloreto de sódio (NaCl) 0.9%, pesados, congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados à -80°C.

### **Homogeneização dos tecidos**

Os tecidos musculares foram homogeneizados em cloreto de potássio (KCl) 1.15%, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e TRITON 10%, resfriados em gelo. O homogenato foi centrifugado à 1000 g durante 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e congelado à -80°C.

### **Quantificação de proteínas**

A quantificação de proteína seguiu o método de Lowry [23].

### **Análise de espécies reativas de oxigênio (EROs)**

O método utiliza a oxidação do reagente 2', 7'-diclorofluorescina (DCFH), uma substância não fluorescente, por EROs, gerando o produto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Leitura em espectrofotômetro de fluorescência (LS 55, Perkin Elmer, MA, EUA), com 480 nanômetros (nm) de excitação e 535 nm de emissão [24]. Os resultados foram expressos em picomol por miligrama (pmol/mg) de proteína.

### **Análise da lipoperoxidação**

O método utiliza o ácido tiobarbitúrico (TBARS), o qual reage com o malondialdeído, um produto da lipoperoxidação lipídica causada por EROs. Quando combinados sob certas condições, produzem um composto

de coloração avermelhada. Leitura em espectrofotômetro, a 535 nm [25]. Os resultados foram expressos em nanomol por miligrama (nmol/mg) de proteína.

#### **Análise da atividade da enzima NADPH oxidase (NOX)**

A atividade da enzima NOX foi medida através do decaimento nas concentrações de NADPH. Leitura em espectrofotômetro (Cary 1E UV-Visible, Varian, CA, EUA) a 340 nm [26]. Os resultados foram expressos em nmol NADPH/min/mg de proteína.

#### **Análise de sulfidrilas**

O método utiliza o reagente de Ellman ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB). Os grupamentos tíois nas cadeias laterais proteicas clivam a ligação dissulfeto do DTNB gerando o ânion 2-nitro-5 tiobenzoato (TNB<sup>2-</sup>), de coloração amarela. Leitura em espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200 rt, Biochrom, RU), a 412 nm [27]. Os resultados foram expressos em micromol de DTNB por miligrama de proteína (µm/mg).

#### **Análise da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da enzima SOD foi medida através da inibição da autoxidação do reagente 1,2,3 – benzenotriol (pirogalol) pelo O<sub>2</sub><sup>•-</sup> em meio alcalino. Leitura em espectrofotômetro (Cary 1E UV-Visible, Varian, CA, EUA) a 420 nm durante 1.0 minuto [28]. Os resultados foram expressos em unidades de SOD por miligrama de proteína (U/mg).

#### **Análise da atividade da enzima catalase (CAT)**

O método emprega o decaimento nas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Leitura em espectrofotômetro (Cary 1E UV-Visible, Varian, CA, EUA) a 240 nm durante 1.0 minuto [29]. Os resultados foram expressos em pmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg de proteína.

#### **Análise da atividade da enzima glutaciona peroxidase (GPx)**

O método é uma medida indireta da atividade da GPx, detectando o consumo de NADPH pela Glutaciona Redutase (GR). Leitura em espectrofotômetro (Cary 1E UV-Visible, Varian, CA, EUA) a 340 nm durante 1.5 minutos [30]. Resultados expressos em nmol/min/mg de proteína.

#### **Análise estatística**

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro – Wilk. Para os resultados que apresentaram distribuição normal, foi realizada a análise de variância de duas vias (ANOVA duas – vias), complementada pelo teste de Student – Newman – Keuls. Já os resultados que não apresentaram distribuição normal foram

submetidos ao teste de Kruskal – Wallis. As diferenças foram consideradas significativas quando a probabilidade de erro  $\alpha$  foi menor do que 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## **Resultados**

### **Peso corporal final e peso dos músculos**

Após 14 e 21 dias de indução da HAP, os animais apresentaram, progressivamente, menor ganho de peso comparado ao respectivo grupo controle, MCT 7 dias e MCT 14 dias (Tabela 1).

O músculo diafragma não apresentou diferenças de peso entre os grupos, ao longo do protocolo experimental (Tabela 1). Após 21 dias de indução da HAP, o músculo gastrocnêmio apresentou peso menor comparado com seu controle (Tabela 1).

### **Análise de EROs**

O músculo diafragma não apresentou diferenças na concentração de EROs entre os grupos ao longo do protocolo experimental (Figura 1A). Após 7 dias de indução da HAP, o músculo gastrocnêmio apresentou maior quantidade de EROs comparado com seu controle (Figura 1B).

### **Análise de lipoperoxidação**

Após 7 dias de indução da HAP, tanto o músculo diafragma quanto o gastrocnêmio apresentaram aumentos na lipoperoxidação comparados com seus controles (Figura 2).

### **Análise da atividade da enzima NOX**

O músculo diafragma apresentou aumento da atividade da enzima NOX comparado aos controles, em todos os tempos medidos (Figura 3A). Após 21 dias de indução da HAP, o músculo gastrocnêmio apresentou aumento na atividade da enzima NOX comparado com seu controle (Figura 3B).

### **Análise de sulfidrilas**

Tanto o músculo diafragma quanto o gastrocnêmio não apresentaram diferenças na quantidade de sulfidrilas entre os grupos ao longo do protocolo experimental (Figura 4).

### **Análise da atividade da enzima SOD**

Após 21 dias de indução da HAP, o músculo diafragma apresentou aumento na atividade da enzima SOD comparado com seu controle, grupo MCT 7 dias e grupo MCT 14 dias (Figura 5A). Após 7 dias de indução da

HAP, o músculo gastrocnêmio apresentou aumento na atividade da enzima SOD comparado com seu controle (Figura 5B).

#### **Análise da atividade da enzima CAT**

Após 7 dias de indução da HAP, o músculo diafragma apresentou diminuição na atividade da enzima CAT comparado com seu controle (Figura 6A). Após 14 dias de indução da HAP, o músculo gastrocnêmio apresentou diminuição na atividade da enzima CAT comparado com seu controle e com o grupo MCT 7 dias (Figura 6B).

#### **Análise da atividade da enzima GPx**

Após 21 dias de indução da HAP, o músculo diafragma apresentou aumento na atividade da enzima GPx comparado com seu controle (Figura 7A). Após 7 dias de indução da HAP, o músculo gastrocnêmio apresentou aumento na atividade da ENZIMA GPx comparado com seu controle. Porém, após 14 e 21 dias de indução da HAP, os grupos MCT 14 dias e MCT 21 dias apresentaram diminuição na atividade da enzima GPx comparado com o grupo MCT 7 dias (Figura 7B).

#### **Discussão**

A escolha do diafragma e do gastrocnêmio teve como objetivo observar os diferentes comportamentos de um músculo ventilatório e de um músculo periférico, no contexto do estado redox e de massa muscular, na progressão da HAP.

O peso do diafragma não variou entre grupos induzidos à HAP e seus respectivos controles, em nenhum dos tempos medidos. Portanto não houve atrofia, talvez devido à sobrecarga de trabalho muscular, já que os ratos com HAP apresentam taquipneia. O músculo gastrocnêmio reagiu de forma diferente, demonstrando atrofia no 21º dia nos animais induzidos a HAP, momento no qual os ratos se mostravam extremamente prostrados e apáticos.

No diafragma, não houve alterações nas concentrações de EROs em nenhum dos tempos medidos, entretanto, no 7º dia houve aumento na lipoperoxidação. No gastrocnêmio, no 7º dia, a concentração de EROs estava elevada assim como a lipoperoxidação.

No diafragma, o aumento da atividade da NOX dos animais induzidos à HAP em relação aos respectivos controles, em todos os tempos medidos, pode estar relacionado com a sobrecarga de trabalho de contração. Por ser o principal músculo envolvido no processo de ventilação, sofre sobrecarga de trabalho sob taquipneia. As NOXs se situam no sarcolema, no retículo sarcoplasmático (RS) e nos túbulos transversos [31, 32, 33]. Estudos demonstraram que a contração muscular acarretou na ativação da NOX pela repetida despolarização da membrana sarcoplasmática [33] e, ainda, o  $O_2^{\bullet-}$  gerado pode ter função na liberação de  $Ca^{2+}$  do RS por modificações oxidativas nos receptores de rianodina (RyR), podendo gerar desacoplamento da excitação-contracção [32, 34]. O aumento da lipoperoxidação no 7º dia pode ser consequência da produção de  $O_2^{\bullet-}$  pela NOX, pois o  $O_2^{\bullet-}$  tem meia vida curta devido à dismutação espontânea ou enzimática, mas pode oxidar fosfolípidos adjacentes ao local de produção, como no sarcolema e no RS. No gastrocnêmio, houve aumento da

atividade da NOX somente no 21º dia, em relação ao seu controle. Na literatura há relatos de que o desuso prolongado da musculatura esquelética também acarreta no aumento da atividade da NOX, em um mecanismo que culmina em atrofia [35]. Coincidentemente, no 21º dia, o gastrocnêmio dos animais induzidos à HAP apresentou peso menor em comparação ao respectivo grupo controle. Nota-se que a atividade da NOX aumentou de forma muito acentuada e é pouco provável que tenha causa no aumento da atividade física dos animais, uma vez que, nesse estágio, apresentavam-se extremamente prostrados. Outras causas de aumento da atividade da NOX são os altos níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes como IL-6 [36], TNF- $\alpha$  [35] e ANGII [26]. Estudos em pacientes [37] e em animais induzidos à HAP [38] demonstraram altos níveis séricos de ANGII e aldosterona, as quais contribuem com as alterações vasculares pulmonares e do VD [37, 38]. Em um trabalho publicado em 2006, utilizando cultura celular de células musculares esqueléticas L6 de ratos, provou-se que, no músculo esquelético, a ANGII foi capaz de elevar a atividade da NOX e, ainda, tornar as fibras musculares resistentes à insulina [26], corroborando a teoria metabólica proposta por Paulin e Michelakis [39].

A análise da estabilidade nos níveis de sulfidrilas, tanto no diafragma quanto no gastrocnêmio, merece atenção especial. Proteínas e enzimas, as quais contem grupamentos tióis, fazem parte não somente da defesa antioxidante, mas também da sinalização celular redox-sensível, ativando fatores de transcrição como o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), proteína-1 ativadora (AP-1), fator 2 relacionado ao fator nuclear eritroide 2 (NRF2) e fator induzível por hipóxia (HIF). Estes, por sua vez, são responsáveis pela transcrição de genes de adaptação da célula aos estímulos de estresse, como a transcrição gênica da SOD, CAT e GPx [16, 17, 31]. As redes de controle e regeneração da oxidação de grupamentos -SH incluem várias enzimas como a GPx, a glutationa redutase (GR), a glutaredoxina (Grx), a tioredoxina (Trx) e a tioredoxina redutase (TrxR), além das moléculas GSH e NADPH. A GSH é necessária para que a GPx transforme H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e para que a Grx reduza proteínas com -SH oxidados. A GSSG formada nesses processos deve ser reduzida e reciclada à duas moléculas GSH de pela GR, a qual utiliza NADPH como equivalente redutor. NADPH é necessário para que a TrxR reduza a Trx oxidada quando esta reduz proteínas com -SH oxidados. Não havendo depleção de GSH e de NADPH, o sistema antioxidante baseado nas sulfidrilas pode não sofrer alterações e a sinalização celular composta por modificações pós-traducionais de grupamentos -SH pode manter a função de resposta aos estímulos oxidativos. De fato, Becker e colaboradores, em publicação de 2022, analisaram o músculo gastrocnêmio de ratos induzidos à HAP por MCT após 28 dias e a razão GSH/GSSG se manteve inalterada em relação ao controle [40].

Interessante foi a volta à normalidade na concentração de EROs e lipoperoxidação no 14º dia, no gastrocnêmio, e da lipoperoxidação, no diafragma. Essa volta à normalidade pode ser atribuída ao aumento da atividade da SOD e da GPx no gastrocnêmio no 7º dia, seguido da queda das atividades da CAT e da GPx no 14º dia. Sabe-se, pela literatura, que a elevação nas concentrações de espécies reativas ou danos estruturais celulares ativam mecanismos de sinalização de defesa. Vias clássicas de sinalização redox-sensíveis são a ativação de NF- $\kappa$ B, AP-1 e NRF2, os quais atuam como fatores de transcrição para SOD, CAT e GPx [17, 31, 32, 41, 42].

Nos primeiros 7 dias, os parâmetros que detectam o estresse oxidativo, como níveis de EROs e lipoperoxidação, estão elevados em ambos os músculos. Porém, em 14 dias, os danos são mitigados no diafragma, provavelmente pela ativação dos mecanismos de defesa antioxidantes, os quais são reforçados em 21 dias pelas maiores atividades da SOD e da GPx. No gastrocnêmio, em 14 dias, há estabilização dos danos oxidativos ao mesmo tempo em que ocorrem a redução da atividade da CAT e da GPx. Talvez, entre o 7º e o 14º dia, o gastrocnêmio

passa de um ambiente oxidativo estabilizado para um pró-oxidante, reforçado em 21 dias pela redução da atividade da GPx e da elevação da atividade da NOX. Um ambiente mais oxidativo poderia estar envolvido na sinalização redox-sensível que leva às modificações musculares conhecidas, como as alterações no padrão de fibras, mitocondriais, metabólicas, angiogênicas e, no caso do gastrocnêmio, à atrofia.

### **Conclusão**

Na musculatura esquelética, a HAP leva a mudanças no estado redox celular. A NOX é uma das principais enzimas produtoras de EROs e, devido tanto ao constante trabalho de contração do diafragma quanto pela inatividade do gastrocnêmio, pode ser ativada facilmente, inclusive por mediadores inflamatórios circulantes. O diafragma apresenta melhor proteção contra a oxidação pois, apesar da atividade da NOX estar maior em todos os tempos medidos, não há aumento de EROs e, aos 21 dias, as atividades da SOD e da GPx aumentam. O gastrocnêmio demonstra maior susceptibilidade à oxidação. Apesar de controlar o aumento de EROs e de TBARS entre o 7º e o 14º dia, no 21º dia a atividade elevada da NOX em conjunto com a reduzida atividade da GPx gera ambiente pró-oxidante. Este ambiente pró-oxidante pode estar contribuindo com os mecanismos de perda de massa muscular.

### **Conflitos de Interesse**

Os autores negam qualquer conflito.

### **Apoio Financeiro**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

### **Legendas**

Tabela 1 Peso corporal final e peso dos músculos diafragma e gastrocnêmio, nos grupos controle e monocrotalina, em 7, 14 e 21 dias. Valores representam média  $\pm$  desvio padrão, n amostral de 7-8 por grupo. g: gramas; MCT: monocrotalina; a: ( $p < 0.05$ ) em comparação ao respectivo grupo controle; b: ( $p < 0.05$ ) em comparação com o grupo MCT 7 dias; c: ( $p < 0.05$ ) em comparação com o grupo MCT 14 dias. Fonte: elaborada pelo autor.

Fig. 1 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Figura 1 A, análise de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) no diafragma. Figura 1 B, análise de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) no gastrocnêmio. Valores representam média  $\pm$  desvio padrão, n amostral de 7-8 por grupo. Dados analisados por meio de ANOVA-2 vias. mg: miligramas; prot.: proteína; CTR: controle; MCT: monocrotalina; d: dias; a: ( $p < 0.05$ ) em comparação ao respectivo grupo controle. Fonte: elaborada pelo autor.

Fig. 2 Análise de Lipoperoxidação (TBARS). Figura 2 A, análise de lipoperoxidação (TBARS) no diafragma. Figura 2 B, análise de lipoperoxidação (TBARS) no gastrocnêmio. Valores representam média  $\pm$  desvio padrão, n amostral de 7-8 por grupo. Dados analisados por meio de ANOVA-2 vias. nmol: nanomol; mg: miligramas; CTR: controle; MCT: monocrotalina; d: dias; a: ( $p < 0.05$ ) em comparação ao respectivo grupo controle. Fonte: elaborada pelo autor.

Fig. 3 Atividade da enzima NADPH oxidase (NOX). Figura 3 A, atividade da enzima NADPH oxidase (NOX) no diafragma. Figura 3 B atividade da enzima NADPH oxidase (NOX) no gastrocnêmio. Valores representam média  $\pm$  desvio padrão, n amostral de 7-8 por grupo. Dados analisados por meio de ANOVA-2 vias. nmol: nanomol; min: minuto; mg: miligrama; prot: proteína; CTR: controle; MCT: monocrotalina; d: dias; a: ( $p < 0.05$ ) em comparação ao respectivo grupo controle. Fonte: elaborada pelo autor.

Fig. 4 Análise de Sulfidrilas. Figura 4 A, análise de Sulfidrilas no diafragma. Figura 4 B, análise de Sulfidrilas no gastrocnêmio. Valores representam média  $\pm$  desvio padrão, n amostral de 7-8 por grupo. Dados analisados por meio de ANOVA-2 vias. umol: micromol; mg: miligrama; CTR: controle; MCT: monocrotalina; d: dias. Fonte: elaborada pelo autor.

Fig. 5 Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD). Figura 5 A, atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) no diafragma. Figura 5 B atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) no gastrocnêmio. Valores representam média  $\pm$  desvio padrão, n amostral de 7-8 por grupo. Dados analisados por meio de ANOVA-2 vias. U: unidade; mg: miligrama; prot.: proteína; CTR: controle; MCT: monocrotalina; d: dias; a: ( $p < 0.05$ ) em comparação ao respectivo grupo controle; b: ( $p < 0.05$ ) em comparação com o grupo MCT 7d; c: ( $p < 0.05$ ) em comparação com o grupo MCT 14d. Fonte: elaborada pelo autor.

Fig. 6 Atividade da enzima Catalase (CAT). Figura 6 A, atividade da enzima Catalase (CAT) no diafragma. Figura 6 B atividade da enzima Catalase (CAT) no gastrocnêmio. Valores representam média  $\pm$  desvio padrão, n amostral de 7-8 por grupo. Dados analisados por meio de ANOVA-2 vias. Ativ.: atividade; pmol: picomol; mg: miligrama; prot.: proteína; CTR: controle; MCT: monocrotalina; d: dias; a: ( $p < 0.05$ ) em comparação ao respectivo grupo controle; b: ( $p < 0.05$ ) em comparação com o grupo MCT 7d. Fonte: elaborada pelo autor.

Fig. 7 Atividade da enzima Glutationa Peroxidase (GPx). Figura 7 A, atividade da enzima Glutationa Peroxidase (GPx) no diafragma. Figura 7 B atividade da enzima Glutationa Peroxidase (GPx) no gastrocnêmio. Valores representam média  $\pm$  desvio padrão, n amostral de 7-8 por grupo. Dados analisados por meio de ANOVA-2 vias. Ativ.: atividade; nmol: nanomol; min: minuto; mg: miligrama; prot.: proteína; CTR: controle; MCT: monocrotalina; d: dias; a: ( $p < 0.05$ ) em comparação ao respectivo grupo controle; b: ( $p < 0.05$ ) em comparação com o grupo MCT 7d. Fonte: elaborada pelo autor.

**Tabela 1 - Peso corporal final e peso final dos músculos diafragma e gastrocnêmio**

Parâmetros	7 Dias		14 Dias		21 Dias	
	Controle	MCT	Controle	MCT	Controle	MCT
<b>Peso corporal final</b>						
(g)	34±8	25±8	71±12	53±9 <sup>ab</sup>	139±14	71±15 <sup>abc</sup>
<b>Peso Diafragma</b>						
(g)	0.67±0.07	0.52±0.07	0.62±0.07	0.57±0.11	0.69±0.14	0.57±0.09
<b>Peso Gastrocnêmio</b>						
(g)	1.14±0.09	1.16±0.10	1.30±0.06	1.34±0.10	1.69±0.15	1.44±0.13 <sup>a</sup>

Fig. 2 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

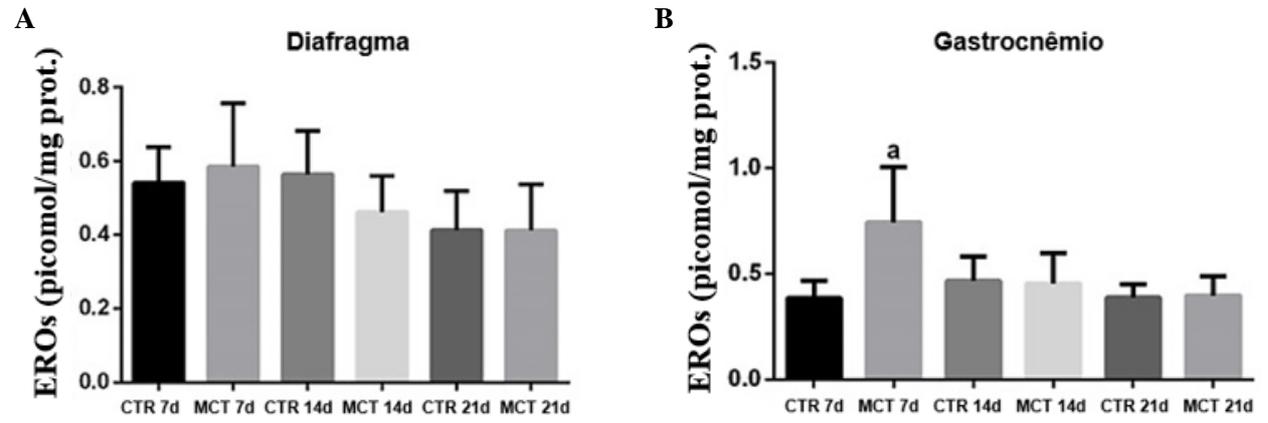


Fig. 2 Análise de Lipoperoxidação (TBARS)

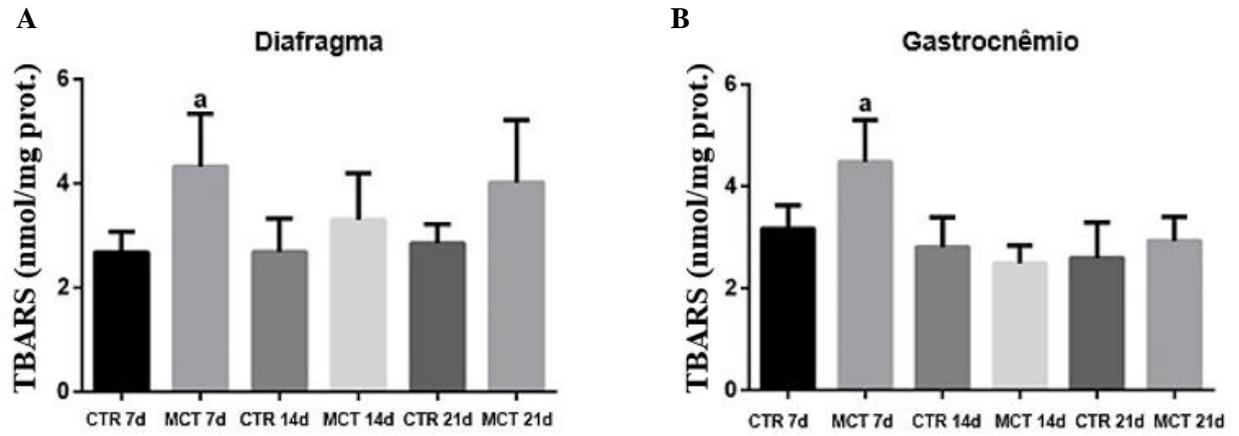


Fig. 3 Atividade da enzima NADPH oxidase (NOX)

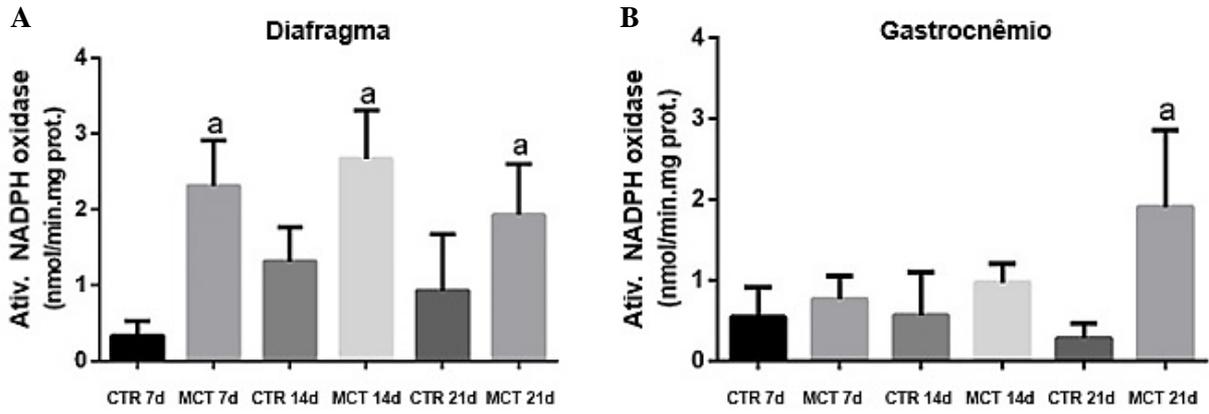


Fig. 4 Análise de Sulfidrilas

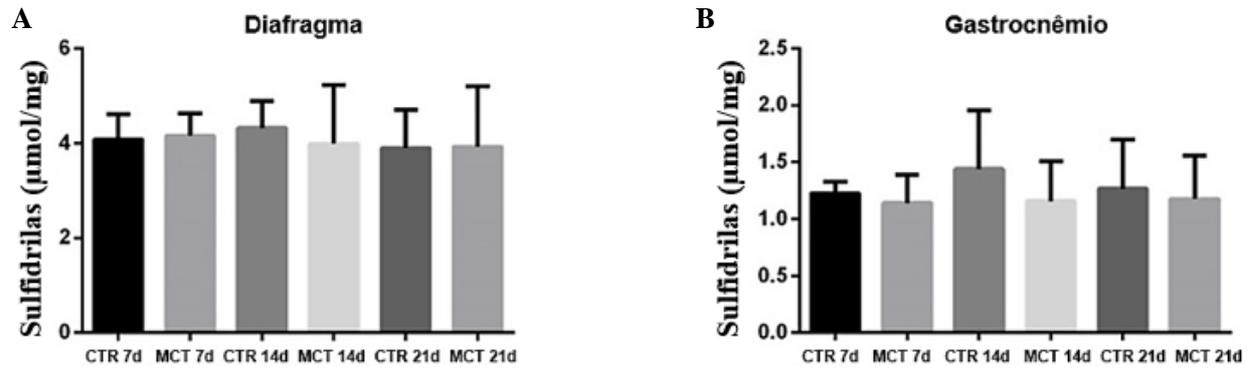


Fig. 5 Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

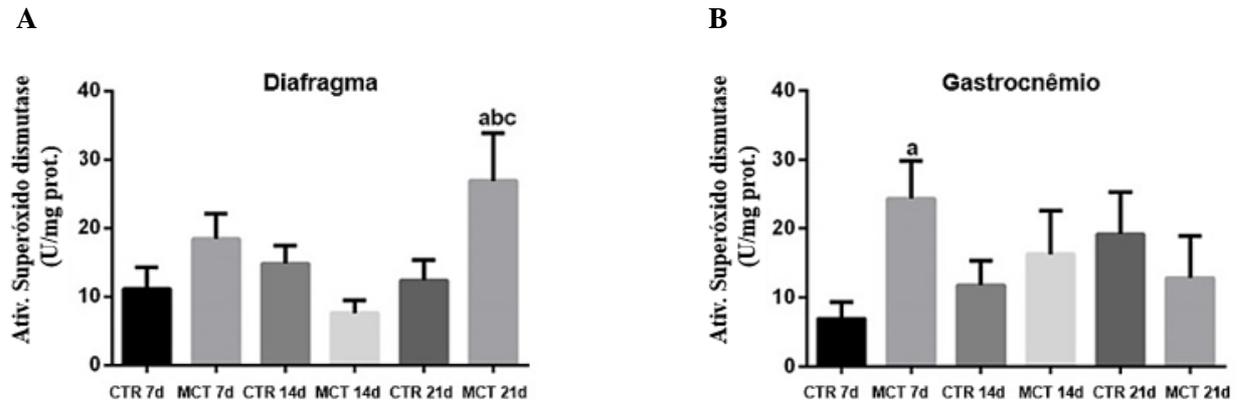


Fig. 6 Atividade da enzima Catalase (CAT)

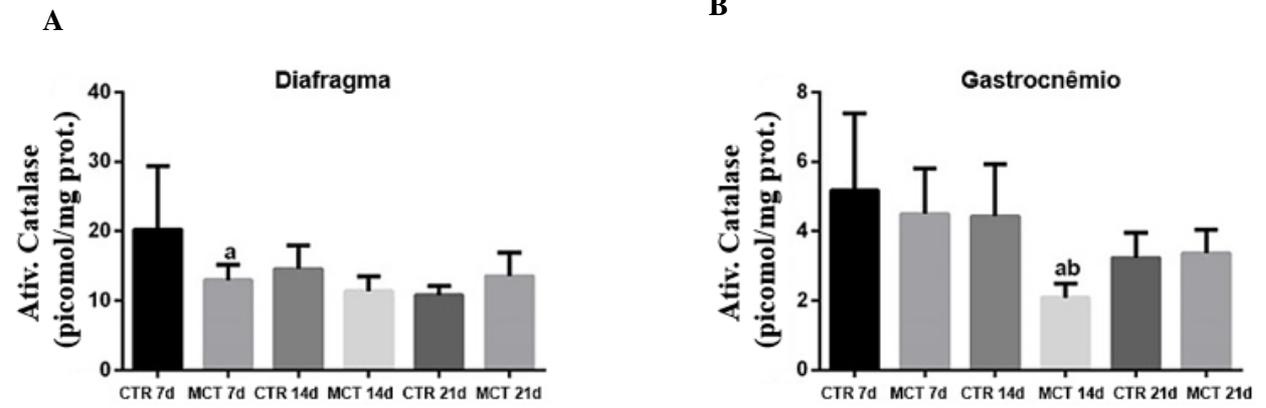
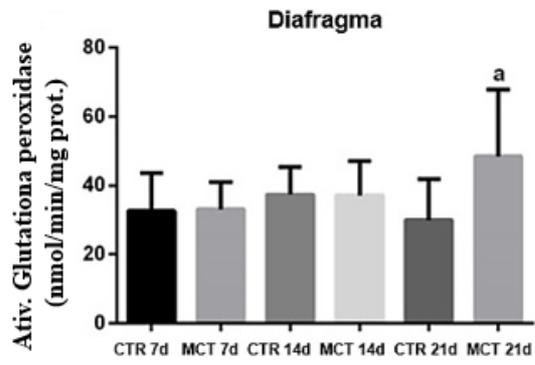
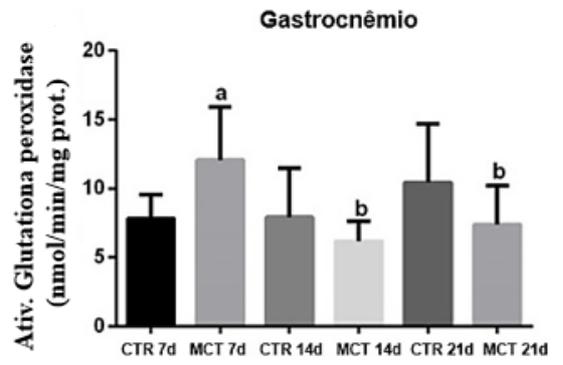


Fig 7 Atividade da enzima Glutationa Peroxidase (GPx)

A



B



## Referências Bibliográficas

1. Hoeper, Marius M. et al. (2016) A global view of pulmonary hypertension. *The Lancet Respiratory Medicine*, v. 4, n. 4, p. 306-322. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00543-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00543-3).
2. Levine, Deborah Jo (2021) Pulmonary arterial hypertension: updates in epidemiology and evaluation of patients. *The American Journal of Managed Care*, v. 27, n.3 (supl), p. S35–S41. <https://doi.org/10.37765/ajmc.2021.88609>.
3. Montani, David et al. (2013) Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v. 8, n. 97. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-97>.
4. Simonneau, Gérald et al. (2019) Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*, v. 53, n. 1, ID 1801913. <http://doi.org/10.1183/13993003.01913-2018>.
5. Sysol, Justin R.; Machado, Roberto F. (2018) Classification and pathophysiology of pulmonary hypertension. *Continuing Cardiology Education*, v. 4, n. 1, p. 2-12. <https://doi.org/10.1002/cce2.71>.
6. Malenfant, Simon et al. (2013) Signal transduction in the development of pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary Circulation*, v. 3, n. 2, p. 278-293. <https://doi.org/10.4103/2045-8932.114752>.
7. Thenappan, Thenappan et al. (2016) The critical role of pulmonary arterial compliance in pulmonary hypertension. *Annals of the American Thoracic Society*, v. 13, n. 2, p. 276-284. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201509-599FR>. Acesso em: 05 jun. 2020.
8. Sanz, Javier et al. (2019) Anatomy, function, and dysfunction of the right ventricle. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 73, n. 12, p. 1463-1482. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.12.076>.
9. Ryan, John J. et al. (2015) Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension. *Canadian Journal of Cardiology*, v. 31, n. 4, p. 391-406. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2015.01.023>.
10. Halank, Michel et al.(2013) Exercise capacity affects quality of life in patients with pulmonary hypertension. *Lung*, v. 191, n. 4, p. 337–343. <https://doi.org/10.1007/s00408-013-9472-6>.
11. Malenfant, Simon et al. (2021) Exercise intolerance in pulmonary arterial hypertension: insight into central and peripheral pathophysiological mechanisms. *European Respiratory Review: an official journal of the European Respiratory Society*, v. 30, n. 160, 200284. <https://doi.org/10.1183/16000617.0284-2020>.
12. Malenfant, Simon et al. (2015) Impaired skeletal muscle oxygenation and exercise tolerance in pulmonary hypertension. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 47, n. 11, p. 2273–2282. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000696>.
13. Potus, François et al.(2014) Impaired angiogenesis and peripheral muscle microcirculation loss contribute to exercise intolerance in pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 190, n. 3, p. 318-328. <https://doi.org/10.1164/rccm.201402-0383OC>.
14. Malenfant, Simon et al. (2015) Skeletal muscle proteomic signature and metabolic impairment in pulmonary hypertension. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, v. 93, n. 5, p. 573-584. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1244-0>.
15. Batt, Jane et al. (2014) Skeletal muscle dysfunction in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 50, n. 1, p. 74-86. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0506OC>.
16. Sies, Helmut; Jones, Dean P. (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, v. 21, n. 7, p. 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>.

17. Ji, Li Li. (2007) Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Experimental Gerontology*, v. 42, n. 7, p. 582–593. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.03.002>.
18. Sies, Helmut. (2021) Oxidative eustress: on constant alert for redox homeostasis. *Redox Biology*, v. 41, 101867. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101867>.
19. Hanschmann, Eva-Maria et al. (2013) Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins-molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, v.19, n. 13, p. 1539-1605. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4599>.
20. Thomas, James A.; Mallis, Robert J. (2001) Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls. *Experimental Gerontology*, v. 36, n. 9, p. 1519–1526. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(01\)00137-1](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(01)00137-1).
21. Zimmer, Alexandra et. al. (2021) The progression of pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline is characterized by lung nitrosative and oxidative stress, and impaired pulmonary artery reactivity. *European Journal of Pharmacology*, v. 891, 173699. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173699>.
22. Zimmer, Alexandra et. al. (2020) Role of inflammation, oxidative stress, and autonomic nervous system activation during the development of right and left cardiac remodeling in experimental pulmonary arterial hypertension. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 464, n. 1-2, p. 93–109. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03652-2>.
23. Lowry, Oliver H. et al. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265 – 275. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021-9258\(19\)52451-6](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021-9258(19)52451-6).
24. Lebel, Carl P.; Ischiropoulos, Harry; Boundy, Stephen C. (1992) Evaluation of the probe 2', 7' dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, v. 5, n. 2, p. 227-231. <https://doi.org/10.1021/tx00026a012>.
25. Buege, J. A.; AUST, S. D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, v. 52, p. 302 – 310. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6).
26. Wei, Yongzhong. et al. (2006) Angiotensin II – induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 46, p. 35137 – 35146. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601320200>.
27. Ellman, George L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 82, n. 1, p. 70-77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).
28. Marklund, Stefan (1985) Pyrogallol autoxidation. In: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* by Robert A. Greenwald. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, p. 243-247. <https://doi.org/10.1201/9781351072922>.
29. Chance, Britton; Sies, Helmut; Boveris, Alberto. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, v. 59, n. 3, p. 527-605. <https://doi.org/10.1152/physrev.1979.59.3.527>.
30. Flohé, Leopold; Günzler, Wolfgang A. (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, v. 105, p. 114-120. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05015-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05015-1).
31. Le Moal, Emmeran et al. (2017) Redox control of skeletal muscle regeneration. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 27, n. 5, p. 276–310. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6782>.
32. Powers, Scott K.; Jackson, Malcolm J. (2008) Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews*, v. 88, n. 4, p. 1243–1276. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2007>.
33. Sakellariou, Giorgos Konstantinos et al. (2013) Studies of mitochondrial and nonmitochondrial sources implicate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase(s) in the increased skeletal muscle superoxide

generation that occurs during contractile activity. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 18, n. 6, p. 603–621. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4623>.

34. Sun, Junhui et al. (2001) Classes of thiols that influence the activity of the skeletal muscle calcium release channel. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 19, p. 15625–15630. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100083200>.

35. Powers, Scott K.; Ozdemir, Mustafa; Hyatt, Hayden (2020) Redox control of proteolysis during inactivity-induced skeletal muscle atrophy. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 33, n. 8, p. 559–569. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.8000>.

36. Soon, Elaine et al. (2010) Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, v. 122, n. 9, p. 920–927. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.933762>.

37. De Man, Frances S. et al. (2012) Dysregulated renin-angiotensin-aldosterone system contributes to pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 186, n. 8, p. 780–789. <https://doi.org/10.1164/rccm.201203-0411OC>.

38. Malikova, Eva et al. (2016) Local and systemic renin-angiotensin system participates in cardiopulmonary-renal interactions in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the rat. *Molecular And Cellular Biochemistry*, v. 418, n. 1-2, p. 147–157. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2740-z>.

39. Paulin, Roxane; Michelakis, Evangelos D. (2014) The metabolic theory of pulmonary arterial hypertension. *Circulation Research*, v. 115, n. 1, p. 148–164. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.301130>.

40. Becker, Cristiano Urbano et al. (2022). Exercise training decreases oxidative stress in skeletal muscle of rats with pulmonary arterial hypertension. *Archives of Physiology and Biochemistry*, v. 128, n. 5, p. 1330–1338. <https://doi.org/10.1080/13813455.2020.1769679>.

41. Jackson, Malcolm J. (2011) Control of reactive oxygen species production in contracting skeletal muscle. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 15, n. 9, p. 2477–2486. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3976>.

42. Powers, Scott K.; Talbert, Erin. E.; Adhietty, Peter J. (2011) Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, v. 589, n. 9, p. 2129–2138. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.201327>.

## 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os principais resultados demonstram que, na musculatura esquelética, a HAP leva a mudanças no estado redox celular. A NOX é uma das principais enzimas produtoras de EROs e, devido tanto ao constante trabalho de contração do diafragma quanto pela inatividade no gastrocnêmio, pode ser ativada facilmente, inclusive por mediadores inflamatórios circulantes. O diafragma apresenta melhor proteção contra a oxidação pois, apesar da atividade da NOX estar maior em todos os tempos medidos, não há aumento de EROs e, aos 21 dias, as atividades da SOD e da GPx aumentam. O gastrocnêmio demonstra maior susceptibilidade à oxidação. Apesar de controlar o aumento de EROs e de TBARS entre o 7° e o 14° dia, no 21° dia a atividade elevada da NOX em conjunto com a reduzida atividade da GPx gera ambiente pró-oxidante. Este ambiente pró-oxidante pode estar contribuindo com os mecanismos de perda de massa muscular. Os méritos deste trabalho de pesquisa são o pioneirismo na análise temporal do estado redox, na musculatura esquelética, no modelo de indução da HAP pela monocrotalina, visto que há uma escassez na literatura sobre a participação das EROs e sua contribuição nas alterações musculares já descritas.

Como perspectivas, seria de grande valor científico uma análise mais aprofundada dos mecanismos envolvidos nas alterações musculares. Análises temporais histológicas dos músculos, visando alterações no diâmetro das fibras, mudanças no tipo de fibras e inflamação local. Também análises temporais da expressão proteica por Western Blot, visando avaliar o balanço de síntese e degradação proteica, representado pelas proteínas MuRF-1 e Atrogina-1, já que há atrofia muscular. Além disso, avaliar temporalmente a razão GSH/GSSG e os níveis celulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, importante segundo mensageiro, e outros parâmetros de dano, como carbonilas e 4-hidroxi-nonenal. Também níveis séricos de IL-6, TNF- $\alpha$  e ANGII. Dessa forma, poderíamos estabelecer com maior profundidade as ligações temporais entre os estados redox celulares e os mecanismos que levam às alterações musculares encontradas na HAP.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANAS'EV, Igor. ROS and RNS signaling in heart disorders: could antioxidant treatment be successful?. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2011, ID 293769, set. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2011/293769>. Acesso em: 25 maio 2020.

BADESCH, David B. et al. Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry. **Chest**, v. 137, n. 2, p. 376–387, fev. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1378/chest.09-1140>. Acesso em: 02 abr. 2023.

BATT, Jane et al. Skeletal muscle dysfunction in idiopathic pulmonary arterial hypertension. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 50, n. 1, p. 74-86, jan. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0506OC>. Acesso em: 26 mai. 2020.

BELKNAP, James K. et al. Hypoxia increases bromodeoxyuridine labeling indices in bovine neonatal pulmonary arteries. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 16, n. 4, p. 366–371, abr. 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.16.4.9115746>. Acesso em: 02 abr. 2023.

BRUGGEN, Cathelijne E. E. van der et al. RV pressure overload: from hypertrophy to failure. **Cardiovascular Research**, v. 113, n. 12, p. 1423-1432, out. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx145>. Acesso em: 06 jun. 2020.

CHAO, Tang et. al. Characteristics of inflammation process in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 133, 111081, jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111081>. Acesso em: 25 jan. 2023.

CHELLADURAI, Prakash; SEEGER, Werner; PULLAMSETTI, Soni Savai. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in pulmonary hypertension. **European Respiratory Journal**, v. 40, n. 3, p. 766-782, set. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1183/09031936.00209911>. Acesso em: 28 jun. 2020.

CONDON, David F. et al. The 6th world symposium on pulmonary hypertension: what's old is new. **F1000Research**, v. 8, p. F1000 Faculty Rev-888, jun. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.12688/f1000research.18811.1>. Acesso em: 03 jun. 2020.

DARBY, Ian A.; HEWITSON, Tim D. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. **International Review of Cytology**, v. 257, p. 143–179, 2007. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(07\)57004-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(07)57004-X). Acesso em: 11 jul. 2020.

DAVENPORT, Anthony P. et al. Endothelin. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 2, p. 357-418, abr. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/pr.115.011833>. Acesso em: 07 mar. 2023.

DUSEMUND, Birgit. Risk assessment of pyrrolizidine alkaloids in food of plant and animal origin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 115, p. 63–72, maio 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.03.005>. Acesso em: 15 jan. 2023.

FAN, Yong et al. Phenotype and function of macrophage polarization in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension rat model. **Physiological Research**, v. 70, n. 2, p. 213–226, abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.33549/physiolres.934456>. Acesso em: 02 fev. 2023.

FORMAN, Henry Jay; ZHANG, Hongqiao; RINNA, Alessandra. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, ns. 1-2, p. 1–12, fev-abr. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>. Acesso em: 17 abr. 2023.

FRONTERA, Walter R.; OCHALA, Julien. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. **Calcified Tissue International**, v. 96, n. 3, p. 183–195, mar. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>. Acesso em: 26 mai. 2020.

GOMEZ-ARROYO; Jose G. et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. **American Journal Of Physiology: Lung Cellular And Molecular Physiology**, v. 302, n. 4, p. 363-369, fev. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00212.2011>. Acesso em: 11 fev. 2019.

GORTER, Thomas M.; WILLEMS, Tineke P.; VAN MELLE, Joost P.. Ventricular interdependence in pulmonary arterial hypertension: providing small pieces of a complex puzzle. **European Journal Of Heart Failure**, v. 17, n. 1, p. 1-2, jan. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ejhf.195>. Acesso em: 25 jun. 2020.

GREYSON, Clifford R. The right ventricle and pulmonary circulation: basic concepts. **Revista Española de Cardiología (English Edition)**, v. 63, n. 1, p. 81-95, jan. 2010. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1885-5857\(10\)70012-8](https://doi.org/10.1016/S1885-5857(10)70012-8). Acesso em: 04 jun. 2020.

HANSCHMANN, Eva-Maria et al. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins-molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox

signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.19, n. 13, p. 1539-1605, nov. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4599>. Acesso em: 02 mai. 2023.

HAVELKA, George E.; KIBBE, Melina R. The vascular adventitia: its role in the arterial injury response. **Vascular and Endovascular Surgery**, v. 45, n. 5, p. 381–390, jul. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1538574411407698>. Acesso em: 01 jul. 2020.

HAYNES, William G.; WEBB, David J. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. **The Lancet**, v. 344, p. 852-854, set. 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(94\)92827-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(94)92827-4). Acesso em: 06 abr. 2023.

HE, Yisheng et al. Lung injury induced by pyrrolizidine alkaloids depends on metabolism by hepatic cytochrome P450s and blood transport of reactive metabolites. **Archives of Toxicology**, v. 95, n. 1, p. 103–116, jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02921-0>. Acesso em: 16 jan. 2023.

HEWES, Jenny L. et al. The changing face of pulmonary hypertension diagnosis: a historical perspective on the influence of diagnostics and biomarkers. **Pulmonary Circulation**, v. 10, n. 1, ID 2045894019892801, fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/2045894019892801>. Acesso em: 02 jun. 2020.

HOEPER, Marius M. et al. A global view of pulmonary hypertension. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 4, n. 4, p. 306-322, abr. 2016. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00543-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00543-3). Acesso em: 20 out. 2019.

HUMBERT, Marc et al. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. **Circulation**, v. 122, n. 2, p. 156-163, jul. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.911818>. Acesso em: 02 abr. 2023.

HUXTABLE, Ryan J. Activation and pulmonary toxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, n. 3, p. 371-389, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(90\)90063-8](https://doi.org/10.1016/0163-7258(90)90063-8). Acesso em: 20 jan. 2023.

HUXTABLE, Ryan J. et al. Physicochemical and metabolic basis for the differing neurotoxicity of the pyrrolizidine alkaloids, trichodesmine and monocrotaline. **Neurochemical Research**, v. 21, n. 2, p. 141–146, fev. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02529131>. Acesso em: 21 jan. 2023.

Ji, Jian. et al. Activation of adventitial fibroblasts in the early stage of the aortic transplant vasculopathy in rat. **Transplantation**, v. 89, n. 8, p. 945–953, abr. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181d05aa7>. Acesso em: 07 out. 2020.

KAKUSAKA, Ikuei et al. Effects of various doses of monocrotaline administration on the development of pulmonary hypertension and its regression in rats (em japonês, resumo em inglês). **The Japanese Journal of Thoracic Diseases**, v. 27, n. 1, p. 51–56, jan. 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.11389/jjrs1963.27.51> Acesso em: 28 jan. 2023.

LACHANT, Daniel J. et al. Low dose monocrotaline causes a selective pulmonary vascular lesion in male and female pneumonectomized rats. **Experimental Lung Research**, v. 44, n. 1, p. 51–61, fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01902148.2017.1422157>. Acesso em: 29 jan. 2023.

LAI, Yen-chun et al. Pulmonary arterial hypertension: the clinical syndrome. **Circulation Research**, v. 115, n. 1, p. 115-130, jun. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.301146>. Acesso em: 28 out. 2019.

LAN, Norris S. H. et al. Pulmonary arterial hypertension: pathophysiology and treatment. **Diseases**, v. 6, n. 2, p. 38, maio 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/diseases6020038>. Acesso em: 14 abr. 2019.

LAU, Edmund M. T. et al. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. **Nature Reviews Cardiology**, v. 14, n. 10, p. 603-614, jun. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.84>. Acesso em: 01 mar. 2019.

LEE, Wai-Ting Nicola et al. Predicting survival in pulmonary arterial hypertension in the UK. **European respiratory journal**, v. 40, n. 3, p. 604–611, set. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1183/09031936.00196611>. Acesso em: 02 abr. 2023.

LEICHSENRING - SILVA, Fabiano et. al. Association of the time course of pulmonary arterial hypertension with changes in oxidative stress in the left ventricle. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 38, n. 12, p. 804–810, dez. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05608.x>. Acesso em: 18 fev. 2023.

LEVINE, Deborah Jo. Pulmonary arterial hypertension: updates in epidemiology and evaluation of patients. **The American Journal of Managed Care**, v. 27, n. 3 sup., p. S35–S41, mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.37765/ajmc.2021.88609>. Acesso em: 05 set. 2023.

LING, Yi et al. Changing demographics, epidemiology, and survival of incident pulmonary arterial hypertension. **American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine**, v. 186, n. 8, p. 790-796, out. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1164/rccm.201203-0383OC>. Acesso em: 02 abr. 2023.

MAARMAN, Gerald et al. A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? **Pulmonary Circulation**, v. 3, n. 4, p. 739-756, dez. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/674770>. Acesso em: 10 jan. 2023.

MAIELLARO, Kathryn; TAYLOR, W. Robert. The role of the adventitia in vascular inflammation. **Cardiovascular Research**, v. 75, n. 4, p. 640–648, set. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.06.023>. Acesso em: 10 jul. 2020.

MALENFANT, Simon et al. Signal transduction in the development of pulmonary arterial hypertension. **Pulmonary Circulation**, v. 3, n. 2, p. 278-293, abr. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/2045-8932.114752>. Acesso em: 01 mar. 2019.

MALENFANT, Simon et al. Skeletal muscle proteomic signature and metabolic impairment in pulmonary hypertension. **Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)**, v. 93, n. 5, p. 573-584, mai. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1244-0>. Acesso em: 26 mai. 2020.

MANDERS, Emmy et al. Contractile dysfunction of left ventricular cardiomyocytes in patients with pulmonary arterial hypertension. **Journal Of The American College Of Cardiology**, v. 64, n. 1, p. 28-37, jul. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.04.031>. Acesso em: 25 jun. 2020.

MARRA, Alberto M. et al. Pulmonary arterial hypertension-related myopathy: an overview of current data and future perspectives. **Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases**, v. 25, n. 2, p. 131–139, fev. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2014.10.005>. Acesso em: 26 mai. 2020.

MEYRICK, B.; REID, L. Hypoxia and incorporation of 3H-thymidine by cells of the rat pulmonary arteries and alveolar wall. **The American Journal of Pathology**, v. 96, n. 1, p. 51–70, jul. 1979. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2042349/>. Acesso em: 02 abr. 2023.

MIRONCZUK-CHODAKOWSKA, Iwona; WITKOWSKA, Anna Maria; ZUJKO, Małgorzata Elżbieta. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in Medical Sciences**, v. 63, n. 1, p. 68–78, mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005>. Acesso em: 17 abr. 2023.

MONTANI, David et al. Pulmonary arterial hypertension. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 8, n. 97, jul. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-97>. Acesso em: 01 mar. 2019.

MORRELL, Nicholas W. et al. Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. **Journal Of The American College Of Cardiology**, v. 54, n. 1, p. 20-31, jun. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.04.018>. Acesso em: 08 jan. 2023.

NAEIJE, Robert. Physiology of the pulmonary circulation and the right heart. **Current Hypertension Reports**, v. 15, n. 6, p. 623-631, dez. 2013. Disponível em: <http://doi.org/10.1007/s11906-013-0396-6>. Acesso em: 04 jun. 2020.

NAEIJE, Robert; BADAGLIACCA, Roberto. The overloaded right heart and ventricular interdependence. **Cardiovascular Research**, v. 113, n. 12, p. 1474-1485, out. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx160>. Acesso em: 23 jun. 2020.

NOGUEIRA-FERREIRA, Rita et al. Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 35, p. 8-16, dez. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2015.09.007>. Acesso em: 20 jan. 2022.

PAULIN, Roxane; MICHELAKIS, Evangelos D. The metabolic theory of pulmonary arterial hypertension. **Circulation Research**, v. 115, n. 1, p. 148-164, jun. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.301130>. Acesso em: 15 abr. 2023.

PEACOCK, Andrew John et al. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. **European Respiratory Journal**, v. 30, n. 1, p. 104-109, jul. 2007. Disponível em: <http://doi.org/10.1183/09031936.00092306>. Acesso em: 02 abr. 2023.

POTUS, François et al. Impaired angiogenesis and peripheral muscle microcirculation loss contribute to exercise intolerance in pulmonary arterial hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 190, n. 3, p. 318-328, ago. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1164/rccm.201402-0383OC>. Acesso em: 26 mai. 2020.

RABINOVITCH, Marlene. Elastase and the pathobiology of unexplained pulmonary hypertension. **Chest**, v. 114, n. 3, p. 213-224, set. 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1378/chest.114.3\\_Supplement.213S](https://doi.org/10.1378/chest.114.3_Supplement.213S). Acesso em: 11 mai. 2019.

RADI, Rafael. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: redox pathways in molecular medicine. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 23, p. 5839-5848, maio 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1804932115>. Acesso em: 13 jul. 2020.

RICH, Stuart. Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. **Annals Of Internal Medicine**, v. 107, n. 2, p. 216, ago. 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.7326/0003-4819-107-2-216>. Acesso em: 02 abr. 2023.

ROCA, Gabriela Querejeta et al. Impact of lowering pulmonary vascular resistance on right and left ventricular deformation in pulmonary arterial hypertension. **European Journal Of Heart Failure**, v. 17, n. 1, p. 63-73, jan. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ejhf.177>. Acesso em: 25 jun. 2020.

ROSE, Frank et al. Hypoxic pulmonary artery fibroblasts trigger proliferation of vascular smooth muscle cells: role of hypoxia-inducible transcription factors. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 12, p. 1660–1661, out. 2002. Disponível em: <http://doi.org/10.1096/fj.02-0420fje>. Acesso em: 02 abr. 2023.

RYAN, John J. et al. Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension. **Canadian Journal Of Cardiology**, v. 31, n. 4, p. 391-406, abr. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2015.01.023>. Acesso em: 21 jun. 2020.

SADEGHPOUR, Anita; ALIZADEHASL, Azin. The right ventricle: a comprehensive review from anatomy, physiology, and mechanics to hemodynamic, functional, and imaging evaluation. **Archives of Cardiovascular Imaging**, v. 3, n. 4, p.1-13, fev. 2016. Disponível em: <http://doi.org/10.5812/acvi.35717>. Acesso em: 22 jun. 2020.

SAKAO, Seiichiro; TANABE, Nobuhiro; TATSUMI, Koichiro. The estrogen paradox in pulmonary arterial hypertension. **American Journal Of Physiology: Lung Cellular And Molecular Physiology**, v. 299, n. 4, p. 435-438, out. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00057.2010>. Acesso em: 02 abr. 2023.

SANZ, Javier et al. Anatomy, function, and dysfunction of the right ventricle. **Journal Of The American College Of Cardiology**, v. 73, n. 12, p. 1463-1482, abr. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.12.076>. Acesso em: 06 jun. 2020.

SIMONNEAU, Gérald et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. **European Respiratory Journal**, v. 53, n. 1, ID 1801913, jan. 2019. Disponível em: <http://doi.org/10.1183/13993003.01913-2018>. Acesso em: 27 maio 2020.

SPIEKERKOETTER, Edda et al. Hot topics in the mechanisms of pulmonary arterial hypertension disease: cancer-like pathobiology, the role of the adventitia, systemic involvement, and right ventricular failure. **Pulmonary Circulation**, v. 9, n. 4, ID 2045894019889775, nov. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/2045894019889775>. Acesso em: 01 jul. 2020.

STENMARK, Kurt R. et al. Targeting the adventitial microenvironment in pulmonary hypertension: A potential approach to therapy that considers epigenetic change. **Pulmonary Circulation**, v. 2, n. 1, p. 3–14, jan. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/2045-8932.94817>. Acesso em: 02 abr. 2023.

STENMARK, Kurt R. et al. The adventitia: essential role in pulmonary vascular remodeling. **Comprehensive Physiology**, v. 1, n. 1, p. 141–161, jan. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cphy.c090017>. Acesso em: 09 jul. 2020.

STENMARK, Kurt R.; FRID, Maria; PERROS, Frédéric. Endothelial-to-mesenchymal transition: an evolving paradigm and a promising therapeutic target in PAH. **Circulation**, v. 133, n.18, p. 1734–1737, maio 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022479>. Acesso em: 07 jul. 2020.

SYSOL, Justin R.; MACHADO, Roberto F. Classification and pathophysiology of pulmonary hypertension. **Continuing Cardiology Education**, v. 4, n. 1, p. 2-12, jul. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cce2.71>. Acesso em: 23 fev. 2019.

THENAPPAN, Thenappan et al. The critical role of pulmonary arterial compliance in pulmonary hypertension. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 13, n. 2, p. 276–284, fev. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201509-599FR>. Acesso em: 05 jun. 2020.

THENAPPAN, Thenappan; CHAN, Stephen Y.; WEIR, E. Kenneth. Role of extracellular matrix in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 315, n. 5, p. 1322-1331, nov. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00136.2018>. Acesso em: 11 maio 2019.

THOMAS, James A.; MALLIS, Robert J. Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls. **Experimental Gerontology**, v. 36, n. 9, p. 1519–1526, set. 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(01\)00137-1](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(01)00137-1). Acesso em: 17 abr. 2023.

VALKO, Marian et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1,

p. 44-84, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>. Acesso em: 02 abr. 2023.

VENTETUOLO, Corey E.. The gender/estrogen paradox and the right ventricle in pulmonary vascular disease. **Advances In Pulmonary Hypertension**, v. 10, n. 3, p. 157-158, ago. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.21693/1933-088X-10.3.157>. Acesso em: 02 abr. 2023.

VERHAAR, Marianne C. et al. Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. **Circulation**, v. 97, n. 8, p. 752-756, mar. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.cir.97.8.752>. Acesso em: 06 abr. 2023.

WILSON, D. W. et al. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 22, n. 5-6, p. 307-325, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/10408449209146311>. Acesso em: 19 jan. 2022.

XIAO, Rui et al. Monocrotaline pyrrole induces pulmonary endothelial damage through binding to and release from erythrocytes in lung during venous blood reoxygenation. **American Journal Of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 316, n. 5, p. 798-809, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00279.2018>. Acesso em: 17 jan. 2023.

ZIMMER, Alexandra et. al. Role of inflammation, oxidative stress, and autonomic nervous system activation during the development of right and left cardiac remodeling in experimental pulmonary arterial hypertension. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 464, n. 1-2, p. 93-109, jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03652-2>. Acesso em: 18 fev. 2023.

ZIMMER, Alexandra et. al. The progression of pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline is characterized by lung nitrosative and oxidative stress, and impaired pulmonary artery reactivity. **European Journal of Pharmacology**, v. 891, 173699, jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173699>. Acesso em: 19 fev. 2023.

## ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY

Instructions for Authors

---

### Manuscript Submission

#### **Manuscript Submission**

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

#### **Permissions**

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

#### **Online Submission**

Please follow the hyperlink “Submit manuscript” and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

#### **Source Files**

Please ensure you provide all relevant editable source files at every submission and revision. Failing to submit a complete set of editable source files will result in your article not being considered for review. For your manuscript text please always submit in common word processing formats such as .docx or LaTeX.

#### **Title Page**

Please make sure your title page contains the following information.

#### **Title**

The title should be concise and informative.

#### **Author information**

- The name(s) of the author(s)
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Large Language Models (LLMs), such as ChatGPT, do not currently satisfy our authorship criteria. Notably an attribution of authorship carries with it accountability for the work, which cannot be effectively applied to LLMs. Use of an LLM should be properly documented in the Methods section (and if a Methods section is not available, in a suitable alternative part) of the manuscript.

#### **Abstract**

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

For life science journals only (when applicable)

- Trial registration number and date of registration for prospectively registered trials

- Trial registration number and date of registration, followed by “retrospectively registered”, for retrospectively registered trials

### **Keywords**

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

### Text

#### **Text Formatting**

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. We recommend using Springer Nature’s LaTeX template.

#### **Headings**

Please use no more than three levels of displayed headings.

#### **Abbreviations**

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

#### **Footnotes**

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

#### **Acknowledgments**

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

### References

#### **Citation**

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

#### **Reference list**

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

The entries in the list should be numbered consecutively.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. “<https://doi.org/abc>”).

- **Journal article**  
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>  
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:  
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329
- **Article by DOI**  
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* <https://doi.org/10.1007/s001090000086>
- **Book**  
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- **Book chapter**  
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- **Online document**  
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- **Dissertation**  
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California  
Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see ISSN.org LTWA  
If you are unsure, please use the full journal title.  
Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibliography style file sn-basic.bst which is included in the Springer Nature Article Template.

### Statements & Declarations

The following statements must be included in your submitted manuscript under the heading 'Statements and Declarations'. This should be placed after the References section. Please note that submissions that do not include required statements will be returned as incomplete.

### **Funding**

Please describe any sources of funding that have supported the work. The statement should include details of any grants received (please give the name of the funding agency and grant number).

Example statements:

“This work was supported by [...] (Grant numbers [...] and [...]). Author A.B. has received research support from Company A.”

“The authors declare that no funds, grants, or other support were received during the preparation of this manuscript.”

### **Competing Interests**

Authors are required to disclose financial or non-financial interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Interests within the last 3 years of beginning the work (conducting the research and preparing the work for submission) should be reported. Interests outside the 3-year time frame must be disclosed if they could reasonably be perceived as influencing the submitted work.

Example statements:

“Financial interests: Author A and B declare they have no financial interests. Author C has received speaker and consultant honoraria from Company M. Dr. C has received speaker honorarium and research funding from Company M and Company N. Author D has received travel support from Company O. Non-financial interests: Author D has served on advisory boards for Company M and Company N.”

“The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.”

Please refer to the “Competing Interests” section below for more information on how to complete these sections.

### **Author Contributions**

Authors are encouraged to include a statement that specifies the contribution of every author to the research and preparation of the manuscript.

Example statement:

“All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.”

Please refer to the “Authorship Principles ” section below for more information on how to complete this section.

### **Data Availability**

All original research must include a Data Availability Statement. Data Availability Statements should provide information on where data supporting the results reported in the article can be found. Statements should include, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. When it is not possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, data availability should still be stated in the manuscript along with any conditions for access.

Example statements:

“The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT LINK TO DATASETS]”

“The datasets generated during and/or analysed during the current study are not publicly available due to [REASON(S) WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.”

Please refer to the “Research Data Policy and Data Availability” section below for more information on how to complete this section.

In addition to the above, manuscripts that report the results of studies involving humans and/or animals should include the following declarations:

### **Ethics approval**

Authors of research involving human or animal subjects should include a statement that confirms that the study was approved (or granted exemption) by the appropriate institutional and/or national research ethics committee (including the name of the ethics committee and reference number, if available). For research involving animals, their data or biological material, authors should supply detailed information on the ethical treatment of their animals in their submission. If a study was granted exemption or did not require ethics approval, this should also be detailed in the manuscript.

“This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of University B (Date.../No....)”

“This is an observational study. The XYZ Research Ethics Committee has confirmed that no ethical approval is required.”

For detailed information on relevant ethical standards and criteria, please refer to the sections on “Research involving human participants, their data or biological material”, “Research involving animals, their data or biological material”.

### Tables

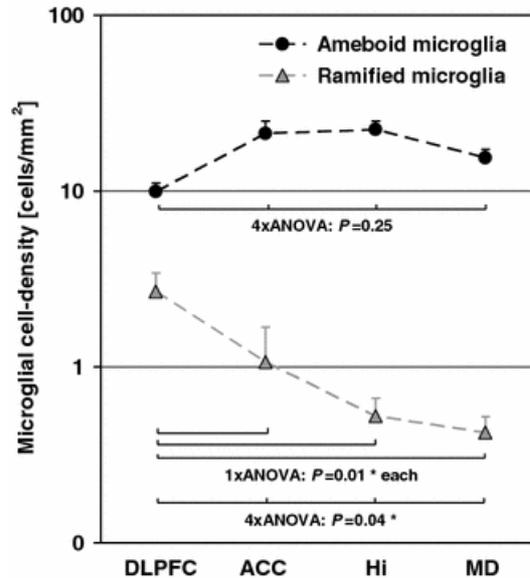
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

### Artwork and Illustrations Guidelines

### **Electronic Figure Submission**

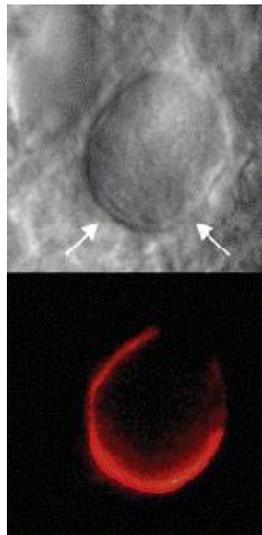
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

### Line Art



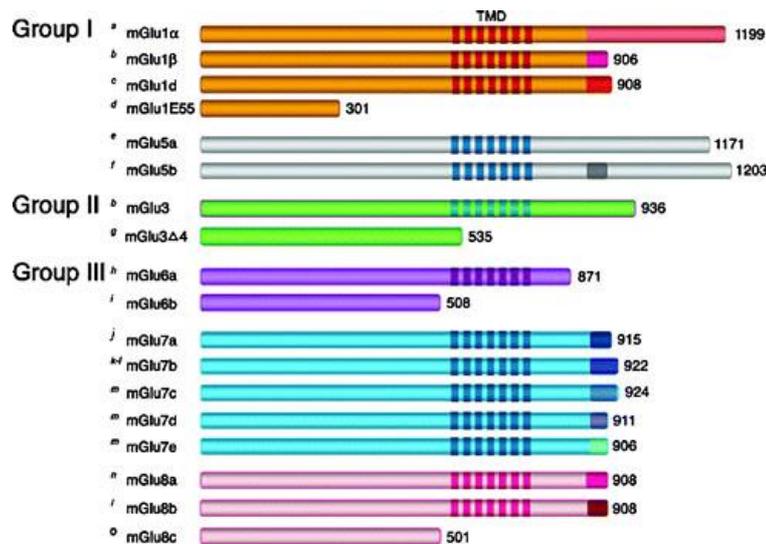
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

### Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

## Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

## Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

## Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

## Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

## Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### Figure Placement and Size

- Figures should be submitted within the body of the text. Only if the file size of the manuscript causes problems in uploading it, the large figures should be submitted separately from the text.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.
- For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

### Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

### Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include\*:

- The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling ('self-plagiarism').
- A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing').
- Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.
- Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

### Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).
- Research articles and non-research articles (e.g. Opinion, Review, and Commentary articles) must cite appropriate and relevant literature in support of the claims made. Excessive and inappropriate self-citation or coordinated efforts among several authors to collectively self-cite is strongly discouraged.

- Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.
- Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).
- Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

\*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded.

If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following COPE guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction:
  - an erratum/correction may be placed with the article
  - an expression of concern may be placed with the article
  - or in severe cases retraction of the article may occur.

The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

- The author's institution may be informed
- A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author's and article's bibliographic record.

### **Fundamental errors**

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

### **Suggesting / excluding reviewers**

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions. When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

#### **Authorship principles**

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

### **Authorship clarified**

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines\*:

All authors whose names appear on the submission

- 1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;
- 2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;
- 3) approved the version to be published; and
- 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

\* Based on/adapted from:

ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors,

Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt et al., PNAS February 27, 2018

### **Disclosures and declarations**

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or non-financial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

### **Data transparency**

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations.

### **Role of the Corresponding Author**

**One author** is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

- ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors;
- managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;\*
- providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the Editor;
- making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).

\* The requirement of managing all communication between the journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

### **Author contributions**

In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the separate title page.

### **Examples of such statement(s) are shown below:**

- Free text:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Example: CRediT taxonomy:

• Conceptualization: [full name], ...; Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name], ...; Writing - review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name],....

For **review articles** where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work.

For articles that are based primarily on the **student's dissertation or thesis**, it is recommended that the student is usually listed as principal author:

A Graduate Student's Guide to Determining Authorship Credit and Authorship Order, APA Science Student Council 2006

### **Affiliation**

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

### **Changes to authorship**

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding Author, and/or changes in the sequence of authors are **not accepted after acceptance** of a manuscript.

- **Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!**

Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current.

Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of the change during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

### **Author identification**

Authors are recommended to use their ORCID ID when submitting an article for consideration or acquire an ORCID ID via the submission process.

### **Deceased or incapacitated authors**

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peer-review process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

### **Authorship issues or disputes**

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

### **Confidentiality**

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

#### **Compliance with Ethical Standards**

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest

- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

competing Interests

**Authors** are requested to disclose interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Interests within the last 3 years of beginning the work (conducting the research and preparing the work for submission) should be reported. Interests outside the 3-year time frame must be disclosed if they could reasonably be perceived as influencing the submitted work. Disclosure of interests provides a complete and transparent process and helps readers form their own judgments of potential bias. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate.

**Editorial Board Members and Editors** are required to declare any competing interests and may be excluded from the peer review process if a competing interest exists. In addition, they should exclude themselves from handling manuscripts in cases where there is a competing interest. This may include – but is not limited to – having previously published with one or more of the authors, and sharing the same institution as one or more of the authors. Where an Editor or Editorial Board Member is on the author list they must declare this in the competing interests section on the submitted manuscript. If they are an author or have any other competing interest regarding a specific manuscript, another Editor or member of the Editorial Board will be assigned to assume responsibility for overseeing peer review. These submissions are subject to the exact same review process as any other manuscript. Editorial Board Members are welcome to submit papers to the journal. These submissions are not given any priority over other manuscripts, and Editorial Board Member status has no bearing on editorial consideration.

Interests that should be considered and disclosed but are not limited to the following:

**Funding:** Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number) and/or research support (including salaries, equipment, supplies, reimbursement for attending symposia, and other expenses) by organizations that may gain or lose financially through publication of this manuscript.

**Employment:** Recent (while engaged in the research project), present or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of this manuscript. This includes multiple affiliations (if applicable).

**Financial interests:** Stocks or shares in companies (including holdings of spouse and/or children) that may gain or lose financially through publication of this manuscript; consultation fees or other forms of remuneration from organizations that may gain or lose financially; patents or patent applications whose value may be affected by publication of this manuscript.

It is difficult to specify a threshold at which a financial interest becomes significant, any such figure is necessarily arbitrary, so one possible practical guideline is the following: "Any undeclared financial interest that could embarrass the author were it to become publicly known after the work was published."

**Non-financial interests:** In addition, authors are requested to disclose interests that go beyond financial interests that could impart bias on the work submitted for publication such as professional interests, personal relationships or personal beliefs (amongst others). Examples include, but are not limited to: position on editorial board, advisory board or board of directors or other type of management relationships; writing and/or consulting for educational purposes; expert witness; mentoring relations; and so forth.

Primary research articles require a disclosure statement. Review articles present an expert synthesis of evidence and may be treated as an authoritative work on a subject. Review articles therefore require a disclosure statement. Other article types such as editorials, book reviews, comments (amongst others) may, dependent on their content, require a disclosure statement. If you are unclear whether your article type requires a disclosure statement, please contact the Editor-in-Chief.

Please note that, in addition to the above requirements, funding information (given that funding is a potential competing interest (as mentioned above)) needs to be disclosed upon submission of the manuscript in the peer

review system. This information will automatically be added to the Record of CrossMark, however it is **not added** to the manuscript itself. Under ‘summary of requirements’ (see below) funding information should be included in the ‘**Declarations**’ section.

### Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a ‘Declarations’ section before the reference list under a heading of ‘Funding’ and/or ‘Competing interests’. Other declarations include Ethics approval, Consent, Data, Material and/or Code availability and Authors’ contribution statements.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

When all authors have the same (or no) conflicts and/or funding it is sufficient to use one blanket statement.

#### Examples of statements to be used when funding has been received:

- Partial financial support was received from [...]
- The research leading to these results received funding from [...] under Grant Agreement No[...].
- This study was funded by [...]
- This work was supported by [...] (Grant numbers [...] and [...])

#### Examples of statements to be used when there is no funding:

- The authors did not receive support from any organization for the submitted work.
- No funding was received to assist with the preparation of this manuscript.
- No funding was received for conducting this study.
- No funds, grants, or other support was received.

#### Examples of statements to be used when there are interests to declare:

- **Financial interests:** Author A has received research support from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company Wand owns stock in Company X. Author C is consultant to company Y.  
**Non-financial interests:** Author C is an unpaid member of committee Z.
- **Financial interests:** The authors declare they have no financial interests.  
**Non-financial interests:** Author A is on the board of directors of Y and receives no compensation as member of the board of directors.
- **Financial interests:** Author A received a speaking fee from Y for Z. Author B receives a salary from association X. X where s/he is the Executive Director.  
**Non-financial interests:** none.
- **Financial interests:** Author A and B declare they have no financial interests. Author C has received speaker and consultant honoraria from Company M and Company N. Dr. C has received speaker honorarium and research funding from Company M and Company O. Author D has received travel support from Company O.  
**Non-financial interests:** Author D has served on advisory boards for Company M, Company N and Company O.

#### Examples of statements to be used when authors have nothing to declare:

- The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.
- The authors have no competing interests to declare that are relevant to the content of this article.
- All authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest or non-financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.
- The authors have no financial or proprietary interests in any material discussed in this article.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

After acceptance

Upon acceptance, your article will be exported to Production to undergo typesetting. Once typesetting is complete, you will receive a link asking you to confirm your affiliation, choose the publishing model for your article as well as arrange rights and payment of any associated publication cost.

Once you have completed this, your article will be processed and you will receive the proofs.

### Article publishing agreement

Depending on the ownership of the journal and its policies, you will either grant the Publisher an exclusive licence to publish the article or will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher.

### **Offprints**

Offprints can be ordered by the corresponding author.

### **Color illustrations**

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

### **Proof reading**

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

### **Online First**

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

#### **Open Choice**

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Article processing charges (APCs) vary by journal – view the full list

#### **Benefits:**

- Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.
- Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average\*.
- Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications. It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

\*) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

#### **Open Choice**

Funding and Support pages

### **Copyright and license term – CC BY**

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Find more about the license agreement

#### **Research Data Policy and Data Availability Statements**

This journal follows Springer Nature research data policy. Sharing of all relevant research data is strongly encouraged and authors must add a Data Availability Statement to original research articles.

Research data includes a wide range of types, including spreadsheets, images, textual extracts, archival documents, video or audio, interview notes or any specialist formats generated during research.

### **Data availability statements**

All original research must include a data availability statement. This statement should explain how to access data supporting the results and analysis in the article, including links/citations to publicly archived datasets analysed or generated during the study. Please see our full policy here.

If it is not possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, this statement should describe how data can be accessed and any conditions for reuse. Participant consent should be obtained and documented prior to data collection. See our guidance on sensitive data for more information.

When creating a data availability statement, authors are encouraged to consider the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article.

Further guidance on writing a data availability statement, including examples, is available at:

Data availability statements

### **Data repositories**

Authors are strongly encouraged to deposit their supporting data in a publicly available repository. Sharing your data in a repository promotes the integrity, discovery and reuse of your research, making it easier for the research community to build on and credit your work.

See our data repository guidance for information on finding a suitable repository.

We recommend the use of discipline-specific repositories where available. For a number of data types, submission to specific public repositories is mandatory.

See our list of mandated data types.

The journal encourages making research data available under open licences that permit reuse. The journal does not enforce use of particular licences in third party repositories. You should ensure you have necessary rights to share any data that you deposit in a repository.

### **Data citation**

The journal recommends that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely. This includes data the authors are sharing alongside their publication and any secondary data the authors have reused. Data citations should include a persistent identifier (such as a DOI), should be included in the reference list using the minimum information recommended by DataCite (Dataset Creator, Dataset Title, Publisher [repository], Publication Year, Identifier [e.g. DOI, Handle, Accession or ARK]) and follow journal style.

See our further guidance on citing datasets.

### **Research data and peer review**

If the journal that you are submitting to uses double-anonymous peer review and you are providing reviewers with access to your data (for example via a repository link, supplementary information or data on request), it is strongly suggested that the authorship in the data is also anonymised. There are data repositories that can assist with this and/or will create a link to mask the authorship of your data.

### **Support with research data policy**

Authors who need help understanding our data sharing policy, finding a suitable data repository, or organising and sharing research data can consult our Research Data Helpdesk for guidance.

See our FAQ page for more information on Springer Nature's research data policy.

### **Open access publishing**

---

To find out more about publishing your work Open Access in Molecular and Cellular Biochemistry, including information on fees, funding and licenses, visit our Open access publishing page.