

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

RODRIGO HERNANDES PALUDO

**EFEITOS DO CARVEDILOL NA CAQUEXIA CARDÍACA INDUZIDA POR
MONOCROTALINA**

Porto Alegre

2024

Rodrigo Hernandez Paludo

**EFEITOS DO CARVEDILOL NA CAQUEXIA CARDÍACA INDUZIDA POR
MONOCROTALINA**

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

Orientador(a): Prof. Dra. Adriane Belló-Klein
Coorientador(a): Prof. Dra. Cristina Campos-Carraro

Porto Alegre

2024

*“Quero deixar minhas pegadas sobre as areias do tempo
Saber que havia algo lá e que isso significou algo que eu deixei como legado
Eu estive aqui
Eu vivi, eu amei
Eu estive aqui
O tempo é precioso.
Então ame agora, ame sempre.” - Beyoncé Knowles-Carter*

AGRADECIMENTOS:

- Agradeço primeiramente a **Deus**, pelo Dom da vida, por me guiar sempre.
- A minha grande família é composta pela minha Mãe **Karla Hernandez**, meu Pai **Sérgio Paludo**, minha Madrasta **Rozangela**, meus irmãos **Renann, João, Yngrid, Nicolly e Carolina** e meu sobrinho **Vicente**, obrigado por todo o apoio e incentivo. Amo vocês. Aos pets Bettina e Fred, obrigado pelo amor incondicional.
- Aos familiares do Sr. João Raul Hernandez (in memoriam) e da Sra. Otília (in memoriam), estou honrado de ser o primeiro da família a buscar esse título, espero que as próximas gerações se motivem a buscar novos desafios.
- Aos familiares do Sr. David Paludo (in memoriam) e da Sra. Terezinha (in memoriam), obrigado por todas as lições que seguiram por gerações até chegar a mim.
- A minha tia Tânia e Jorge, aos padrinhos Enio e Daner (in memoriam), as madrinhas Eva, Edaci e Josiane, aos primos mais próximos de mim nessa jornada Lucas Nathann, Denver, Daverson e Tiago e todos os outros que torcem por mim, só tenho que agradecer o amor, carinho e torcida nessa caminhada. Gratidão!
- Aos meus amigos, queridos de coração, não os citarei nomes aqui, mas saibam que todos vocês são especiais na minha vida.
- A minha orientadora, Dra. Adriane Belló-Klein, agradeço por todas as orientações e apoio. Muito obrigado por ter aberto as portas do laboratório de fisiologia cardiovascular (UFRGS) para que eu pudesse realizar essa conquista. Serei eternamente grato por isso e por cada ensinamento. Gratidão!
- A minha Co-Orientadora professora Cristina, obrigado pelo suporte neste trabalho.
- Aos membros do laboratório de fisiologia cardiovascular, obrigado pela ajuda na realização desse projeto. Desejo sucesso a todos.
- Aos grupos de pesquisa da professora Fernanda Visioli do PPG odontologia - UFRGS obrigado pela colaboração.
- As gurias do quarteto fisiológico e aos professores do PPG fisiologia - UFRGS, obrigado pelos ensinamentos compartilhados. Levarei um pouco de vocês comigo.
- A CAPES, obrigado pelo incentivo de proporcionar jovens a construírem uma jornada acadêmica.
- A Banca, obrigado pelo tempo e dedicação com esse trabalho, agradeço os feedbacks que foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e profissional.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMO	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	14
1. Hipertensão Pulmonar	14
1.1 Classificação da Hipertensão Pulmonar	15
1.2 Diagnóstico da HAP	16
1.3 Epidemiologia e mortalidade pela HAP	17
1.4 Fisiopatologia da HAP	18
1.5 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA FISIOPATOLOGIA DA HAP	20
1.5.1 Sistema Nervoso Autônomo	20
1.5.2 Estresse Oxidativo	22
1.6 Caquexia Cardíaca	23
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	29
2. JUSTIFICATIVA	29
3. HIPÓTESE	29
4. OBJETIVOS	30
4. OBJETIVOS GERAIS	30
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5. MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1 Aspectos éticos	31
5.2 Animais	31
5.3 Desenho experimental	31
5.4 Grupos experimentais	32
5.5 Modelo de HAP induzido por monocrotalina	33
5.6 Tratamento com carvedilol	33
5.7 Mensuração da ingestão alimentar	33
5.8 Avaliação ecocardiográfica	34
5.9 Avaliação hemodinâmica: cateterismo do VD	34
5.10 Morte dos ratos e retirada das estruturas	34
5.11 Análise da quantidade de tecido adiposo epididimal	35
5.12 Análise histológica	35
5.13 Homogeneização de tecidos	35
5.14 Estresse Oxidativo	35
5.14.1 Concentração total de espécies reativas de oxigênio	35
5.14.2 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	36
5.14.3 Conteúdo de sulfidrilas	36
5.15 Descarte de resíduos	36

5.16 Análise estatística	36
6. RESULTADOS	38
6.1 Análises Ecocardiográficas:	38
6.1.1 Tempo de aceleração e tempo de ejeção pela artéria pulmonar (AT/ET)	38
6.1.2 Parâmetros sistólicos	38
6.1.3 Parâmetros diastólicos	38
6.2 Análises Hemodinâmicas:	39
6.2.1 Frequência cardíaca	39
6.2.2 Pressão sistólica do ventrículo direito	40
6.2.3 Pressão diastólica final do ventrículo direito	40
6.2.4 Pressão média da artéria pulmonar	40
6.2.5 Índice de relaxamento (dP/dt mínima)	40
6.2.6 Índice de contração (dP/dt máxima)	40
6.3 Análises Morfométricas:	41
6.3.1 Peso corporal	42
6.3.2 Ingestão alimentar	43
6.3.3 Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA)	43
6.3.4 Tecido adiposo epididimal	43
6.3.5 Sóleo (g)	43
6.3.6 Gastrocnêmio (g)	43
6.4 Análise Histológica	44
6.5 Análise de Estresse Oxidativo:	46
6.5.1 Espécies Reativas de Oxigênio:	46
6.5.2 Lipoperoxidação (TBARS)	47
6.5.3 Sulfidrilas	48
7. DISCUSSÃO	49
8. CONCLUSÃO	57
9. REFERÊNCIAS	58
10. ANEXOS	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Comparação morfológica de uma artéria pulmonar normal e com hipertensão pulmonar.	18
Figura 02 - Fisiopatologia da HAP	19
Figura 03- Comparação morfológica entre o coração normal e o coração com sobrecarga de pressão, gerando uma sobrecarga de volume no VD.....	19
Figura 04 - Sistema nervoso simpático na hipertensão arterial pulmonar.....	21
Figura 05 - Mecanismo da atrofia muscular esquelética causado pelo estresse oxidativo.....	24
Figura 06 - Propriedades farmacológicas do carvedilol	26
Figura 07 - Foto das vagens, das sementes e das folhas da espécie <i>Crotalaria sp.</i>	27
Figura 08 - Desenho Experimental	32
Figura 09 - Resultados da área média da fibra muscular	44
Figura 10 - Lâmina histológica do músculo sóleo	44
Figura 11 - Lâmina histológica do músculo gastrocnêmio	45
Figura 12 - Resultados da análise de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos músculos sóleo e gastrocnêmio dos grupos.	46
Figura 13 - Resultados da análise de lipoperoxidação pelo método de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos músculos sóleo e gastrocnêmio	47
Figura 14 - Resultados da análise de sulfidrilas nos músculos sóleo e gastrocnêmio.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AD - Átrio direito

AT/ET - Tempo de aceleração e tempo de ejeção

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CREAL - Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

CEA - Coeficiente de Eficiência Alimentar

DCFH-DA - diacetato de 2',7'- diclorofluoresceína

DCF - 2,7-diclorofluoresceína

DdVD - Diâmetro Diastólico do Ventrículo Direito

DMSO - Dimetilsulfóxido

dP/dt mínima - Índice de relaxamento

dP/dt máxima - Índice de contratilidade

DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crônica

DsVD - Diâmetro sistólico do ventrículo direito

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

E/A - Razão entre o enchimento ventricular e a sístole atrial

eROS - espécies reativas de oxigênio

FC - Frequência cardíaca

FENC - Fração de encurtamento

GE - Gordura Epididimal

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HCl - ácido clorídrico

HE - hematoxilina e eosina

HP - Hipertensão pulmonar

HAP - Hipertensão arterial pulmonar

IC - Insuficiência cardíaca

IGE - Índice de gordura epididimal

IL - Interleucinas

IMC - índice de massa corporal

INF γ - Interferon γ

i.p. - Intraperitoneal

MAF - Mudança de área fracional

MCT - Monocrotalina

MCT + C - Grupo monocrotalina + carvedilol
NaCl - Cloreto de sódio
NaOH - Hidróxido de sódio
NO - Óxido nítrico
NOX - NADPH Oxidase
 $^1\text{O}_2$ - oxigênio singlet
 O_2^- - radical superóxido
mPAP - Pressão média na artéria pulmonar
NF- κ B - fator nuclear kappa-B
PCF - peso corporal final
PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonila
pmol - Picomol
PSVD - Pressão sistólica do ventrículo direito
PDFVD - Pressão diastólica final do ventrículo direito
PPAR γ - receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma
RNAm - RNA mensageiro
RP- Restrição Pericárdica
RVP - Resistência vascular periférica
SBCAL - Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SNK - Student–Newman–Keuls
SNS - Sistema nervoso simpático
TAPSE - Excursão sistólica do plano anular da tricúspide
TBARS - Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico
TNB - Ácido 5-tiol-2-nitrobenzoico
TNF α - Fator de necrose tumoral alfa
VE/VCO $_2$ - Equivalente ventilatório de dióxido de carbono
VD - Ventrículo Direito
VS - Volume Sistólico
XO - xantina oxidase

RESUMO

INTRODUÇÃO: A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é caracterizada pelo aumento da resistência vascular pulmonar (RVP) que como consequência produz elevação da pós-carga ao ventrículo direito (VD). A HAP pode também levar à perda de massa muscular esquelética e gerar um quadro de caquexia cardíaca que é uma doença multifatorial, que pode ter diversos mecanismos envolvidos como o estresse oxidativo e a ativação simpática. Desse modo, o carvedilol, um betabloqueador, com função antioxidante, pode ter uma ação protetora contra a perda muscular. **OBJETIVO.** Analisar a ação do carvedilol na prevenção da caquexia cardíaca no modelo de HAP induzida por monocrotalina. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Ratos Wistar machos (± 180 g) foram randomizados em 3 grupos: **Controle** que recebeu solução salina i.p. e veículo do carvedilol por gavagem; **Monocrotalina (MCT)** que recebeu uma dose única de monocrotalina (60 mg/kg i.p.) e veículo por gavagem; **Monocrotalina + Carvedilol (MCT+C)** que, além da MCT, recebeu carvedilol (15 mg/kg, por 12 dias) por gavagem. No 21º dia após a indução do modelo, os animais foram submetidos à ecocardiografia e cateterismo do ventrículo direito (VD). Coletou-se tecido adiposo epididimal e os músculos sóleo e gastrocnêmio foram retirados, pesados e homogeneizados para medida de espécies reativas de oxigênio (eROS), espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e sulfidrilas. Também utilizamos os tecidos sóleo e gastrocnêmio para análises histológicas. Para análise estatística, foi utilizado o teste de normalidade Shapiro Wilk, seguido de ANOVA de uma via, com post-hoc SNK ($p < 0,05$). **RESULTADOS:** Em relação ao ecocardiograma, foi observada redução na razão entre o tempo de aceleração e o tempo de ejeção através da artéria pulmonar no grupo MCT, representando aumento da resistência vascular pulmonar. Além disso, mostrou-se redução nos parâmetros de função sistólica e diastólica do VD. O tratamento com carvedilol reduziu o diâmetro diastólico do VD quando comparado ao grupo MCT, sugerindo um efeito sobre o remodelamento cardíaco. Os ratos do grupo MCT apresentaram aumento da pressão sistólica e diastólica do VD em relação ao grupo controle, sendo este efeito reduzido no grupo MCT+C. Em relação aos resultados morfométricos, observamos que os animais do grupo MCT e MCT + C possuem redução no peso corporal, na ingestão alimentar, na quantidade de tecido adiposo epididimal e no peso do músculo sóleo em relação ao grupo controle. Não observamos efeito do carvedilol sobre os parâmetros morfométricos. Nos dados de histologia, observamos redução na área média da fibra do músculo sóleo nos grupos MCT e MCT +C em relação ao grupo controle. Não observamos redução na área média do músculo gastrocnêmio nem efeito do carvedilol sobre este parâmetro. No grupo MCT, a concentração de

EROS e TBARS de ambos os músculos foi maior que no controle, porém estas foram reduzidas no grupo MCT+C ao compararmos com o MCT. Não houve diferença entre os grupos em relação às sulfidrilas. **CONCLUSÃO:** Nossos resultados mostram que o modelo de HAP por monocrotalina induziu sinais de caquexia cardíaca como perda de peso, redução da área da fibra muscular, anorexia e que o estresse oxidativo pode ser um dos mecanismos envolvidos. O uso do carvedilol reduziu o estresse oxidativo e melhorou parâmetros hemodinâmicos. Em suma, acreditamos que novos estudos avaliando o bloqueio simpático possa ter um papel na caquexia cardíaca e auxiliar a compreender mais aprofundamente essa condição em pacientes com HAP.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by increase in pulmonary vascular resistance (PVR), which leads to an increase in right ventricle (RV) afterload. PAH can also lead to the loss of skeletal muscle mass, and generate cardiac cachexia, which is a multifactorial disease, with several mechanisms involved, such as oxidative stress and sympathetic activation. Thus, the carvedilol, which is a beta-blocker, with antioxidant function, may have a protective action against muscle loss. **OBJECTIVE:** To analyze the action of carvedilol in preventing cardiac cachexia in the monocrotaline PAH model. **MATERIALS AND METHODS:** Male Wistar rats (± 180 g) were randomized into 3 groups: Control that received saline solution i.p. and carvedilol vehicle by gavage; Monocrotaline (MCT) who received a single dose of monocrotaline (60 mg/kg i.p.) and vehicle by gavage; Monocrotaline + Carvedilol (MCT+C) who, in addition to MCT, received carvedilol (15 mg/kg, for 12 days) by gavage. On the 21st day after model induction, rats underwent echocardiography and right ventricular (RV) catheterization. Epididymal adipose tissue was collected and the soleus and gastrocnemius muscles were removed, weighed and homogenized for ROS, TBARS and sulfhydryl analyses. Soleus and gastrocnemius were also used for histological analysis. For statistical analysis, the Shapiro Wilk normality test was used, followed by one-way ANOVA, with post-hoc SNK ($p < 0.05$). **RESULTS:** In relation to the echocardiogram, a reduction in the ratio between acceleration time to the ejection time through the pulmonary artery was observed, suggesting an increase in pulmonary vascular resistance. In addition, a reduction in RV systolic parameters was seen, which represents loss of systolic function and a reduction in the difference between rapid and slow RV filling, representing diastolic dysfunction. A significant effect of carvedilol on RV diastolic diameter when compared to the MCT group was observed, suggesting a reduction in residual volume. Rats in the MCT group showed an increase in RV systolic and diastolic pressure compared to the control group. Regarding the morphometric results, we observed that the animals in the MCT and MCT + C groups had a reduction in body weight, in food intake, in the amount of epididymal adipose tissue and in the weight of the soleus muscle in relation to the control group. We did not observe an effect of carvedilol on morphometric parameters. In histology data, we observed a reduction in the mean fiber area of the soleus muscle in the MCT and MCT +C groups compared to the control group. We did not observe a reduction in the mean area of the gastrocnemius muscle nor any effect of carvedilol on this parameter. In the MCT group, the concentration of ROS and TBARS in both muscles was higher than in the CTR, but these parameters were reduced in the MCT+C group when compared to the MCT. There was no difference between groups in relation to sulfhydryls. **CONCLUSION:** Our results show that the monocrotaline PAH model is capable of induced symptoms of cardiac cachexia such as weight loss, reduction in muscle fiber area, anorexia and that oxidative stress may be one of the mechanisms involved. The use of carvedilol is capable of reduced oxidative stress and

improved hemodynamic parameters. In summary, we believe that new studies should evaluate sympathetic blockade that may play a role in cardiac cachexia, which may help to further understand this condition in patients with PAH.

1. Hipertensão Pulmonar

A hipertensão pulmonar é uma doença que pode envolver diversas condições e pode estar associada a variadas doenças. A hipertensão pulmonar possui sintomas iniciais inespecíficos com uma evolução rápida e com um difícil prognóstico (HOEPER et al., 2011; LIMA-SEOLIN, 2017). Essa doença ocorre de forma associada com outras doenças cardiopulmonares ou de forma independente, com um alto nível de morbidade e mortalidade (KIELY et al., 2013; LIMA-SEOLIN, 2017).

Essa patologia está associada a alterações vasculares, que diminuem o lúmen dos vasos pulmonares e gera um aumento da resistência vascular pulmonar (RVP) com aumento da pressão arterial pulmonar. Com esse aumento da pressão na artéria pulmonar, ocorre a sobrecarga do ventrículo direito (VD), que pode ocasionar a insuficiência do VD (AUSTIN et al., 2013). Desse modo, a HP é uma doença altamente incapacitante, sem cura, com um diagnóstico tardio, fazendo com que ocorra uma alta mortalidade (BADESCH et al., 2010).

1.1 Classificação da Hipertensão Pulmonar

Devido às atualizações sobre a doença e a importância de entender sua fisiopatologia e a diferença etiológica, foi necessário criar grupos para classificar a hipertensão pulmonar, já que ela é uma doença multifatorial e com diversas patologias associadas. Esse debate iniciou na década de 70, onde profissionais de saúde e cientistas reuniram-se na Suíça, no primeiro Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar, para debater como seria realizado o diagnóstico e classificação da hipertensão pulmonar. Esta classificação se baseia em conceitos morfofisiológicos e etiologias variáveis (SYSOL & MACHADO, 2018;). Nesse sentido, novas informações estão sendo atualizadas a cada simpósio, sendo a classificação mais atual realizada pelo 6º Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar (Quadro 1) (HOEPER et al., 2016; AL-QADI et al. 2021; HUMBERT et al., 2022).

QUADRO 01: Classificação da hipertensão pulmonar segundo o 6º Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar (HOEPER et al., 2016; AL-QADI et al., 2021; HUMBERT et al., 2022)

	CLASSIFICAÇÃO
GRUPO 1	Relacionadas à hipertensão arterial pulmonar (HAP) podendo ser de origem idiopática, hereditária, induzida por drogas ou toxinas, decorrentes de patologias como HIV, esquistossomose, doenças no tecido conjuntivo, hipertensão portal e doença cardíaca congênita.
GRUPO 2	Relacionadas a doenças cardíacas esquerdas como: doenças valvares, insuficiência cardíaca com fração de ejeção ventricular esquerda reduzida, insuficiência cardíaca com fração de ejeção ventricular preservada, doenças cardiovasculares induzidas ou congênitas que podem levar a hipertensão pulmonar pós - capilar.
GRUPO 3	Doenças pulmonares ou associadas à hipóxia, podendo ser causadas por DPOC com insuficiência crônica, doença pulmonar obstrutiva, doença pulmonar restritiva, doença pulmonar mista obstrutiva/restritiva, hipóxia e doenças do desenvolvimento pulmonar
GRUPO 4	HP associada à obstrução crônica da artéria pulmonar tais como na doença pulmonar tromboembólica crônica.
GRUPO 5	HP associadas a doenças uni ou multifatoriais, de etiologia desconhecida; consistem em um complexo grupo de doenças associadas à HP.

Fonte: Tabela adaptada de (HUMBERT et al., 2022).

1.2 Diagnóstico da HAP

Estando classificada no grupo 1, a HAP é uma doença diagnosticada a partir de uma análise pressórica onde a medida da pressão média na artéria pulmonar (mPAP) seja ≥ 20 mmHg. Essa medida de pressão média foi definida a partir do estudo de Wolsk et al. (2017), que investigou a mPAP em 62 indivíduos saudáveis de diferentes faixas etárias, e a partir desse estudo concluiu-se que a mPAP para indivíduos saudáveis seria <20 mmHg. O sexto Simpósio Internacional de HP definiu esse valor médio para pessoas saudáveis, sendo um valor superior a isso, um possível parâmetro de investigação para diagnóstico. Portanto, pressões acima desse valor devem ser investigadas. Além do aumento da mPAP, ficou definido que o diagnóstico da HAP também deve ser feito a partir de um contexto clínico como a radiografia de tórax, ecocardiografia, análise de função pulmonar, tomografia computadorizada de tórax, teste cardiopulmonar durante o exercício e o cateterismo do VD, como mostra o quadro 02 (HUMBERT et al., 2022).

1.3 Epidemiologia e mortalidade pela HAP

Registros epidemiológicos mostram que, em países desenvolvidos, há uma incidência de 6 casos por milhão de adultos e prevalência de aproximadamente 50 casos por milhão de adultos (LEBER et al., 2021). A precoce avaliação clínica e diagnóstico da HAP é fundamental para reduzir a taxa de mortalidade dessa doença. Com o diagnóstico precoce, há um aumento na expectativa de vida em 3 anos (ALVES et al., 2015). Apesar de existirem dados sobre a epidemiologia da HAP, estes não podem ser considerados precisos, pois além do alto custo para o diagnóstico, Mocumbi et al, 2015 descrevem que, grande parte dos registros não inclui a HAP associada a outras doenças como a esquistossomose, doença prevalente em algumas regiões da América do Sul e África. Registros de Lau et al. (2017) sugerem que a HAP está sendo diagnosticada em pessoas acima dos 60 anos em países da Europa e Estados Unidos, enquanto no Brasil a média é de 46 anos sendo a primeira causa de HAP a idiopática (ALVES et al., 2015). No entanto, no Brasil, é possível que os dados estejam subestimados devido à difícil condução no diagnóstico clínico. Alves e colaboradores (2015), realizaram um estudo prospectivo de casos incidentes entre 2008 e 2013 e demonstraram que a maioria dos portadores da doença eram mulheres. Estima-se que essa doença acometa uma proporção de $\frac{2}{3}$ dos diagnosticados sendo do sexo feminino. Apesar de uma maior proporção em relação ao diagnóstico em mulheres, a taxa de mortalidade é maior em homens (LAU et al., 2017).

QUADRO 02: Diagnóstico da HAP

EXAMES	ACHADOS
Radiografia de tórax	Aumento do tamanho do átrio direito (AD), do VD e da artéria pulmonar e da espessura dos vasos pulmonares.
Ecocardiografia	Sinais de HP como: VD aumentado em uma visão paraesternal no eixo longo, aumento da velocidade de regurgitação da tricúspide sendo medido em onda contínua de Doppler, diminuição da excursão sistólica do plano anular da tricúspide (TAPSE).
Análise de Função Pulmonar	Normal ou levemente prejudicada
Tomografia Computadorizada de tórax	Diâmetro da artéria pulmonar aumentado, relação artéria pulmonar/aorta aumentada e aumento do diâmetro do ventrículo direito.
Teste Cardiopulmonar durante o exercício	Alta inclinação na razão de equivalente ventilatório de dióxido de carbono (VE/VCO ₂); Baixa pressão expirada de dióxido de carbono (PetCO ₂); Inexistência da ventilação oscilatória de exercício.
Cateterismo do VD	Aumento de parâmetros como a RVP, pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD), pressão diastólica final do VD (PDFVD), mPAP.

Fonte: (HUMBERT et al., 2022)

Nesse sentido, apesar do avanço na Medicina e a criação de fármacos que podem diminuir a mortalidade da doença, ainda há um baixo registro de aumento na sobrevivência de pacientes acometidos com a HAP (ALVES et al., 2015; LAU et al., 2017). Isso pode estar associado à fisiopatologia da doença que é muito complexa e de origem multifatorial.

1.4 Fisiopatologia da HAP

A HAP é uma doença que está associada ao remodelamento e aumento da resistência da vasculatura pulmonar (RVP), e, posteriormente, a uma sobrecarga de pressão do ventrículo direito (AUSTIN et al., 2013). Em relação aos vasos pulmonares, Pugliese e colaboradores (2014) identificaram as características morfológicas, e mostraram que ocorrem alterações que estão associadas à doença, tais como o espessamento da camada média do vaso (composta por músculo liso), reduzindo o raio das artérias pulmonares. Há também aumento de fibroblastos e colágeno, reduzindo a complacência destes vasos, dificultando sua distensão (figura 01).

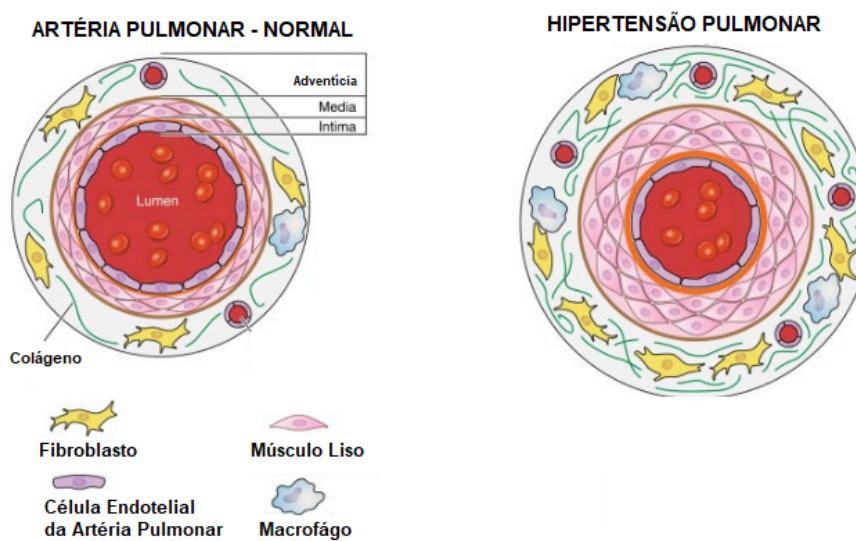


Figura 01- Comparação morfológica de uma artéria pulmonar normal e com hipertensão pulmonar. (Adaptado de PUGLIESE et al., 2014).

Humbert et al. (2022) descrevem que ocorre uma vasculopatia pulmonar progressiva, havendo proliferação da camada íntima da artéria pulmonar e fibrose, além do remodelamento vascular associado à trombose. Essas alterações levam a um aumento da RVP, contribuindo para elevação da pós-carga do VD (HUMBERT et al., 2022), como mostra a figura 02.

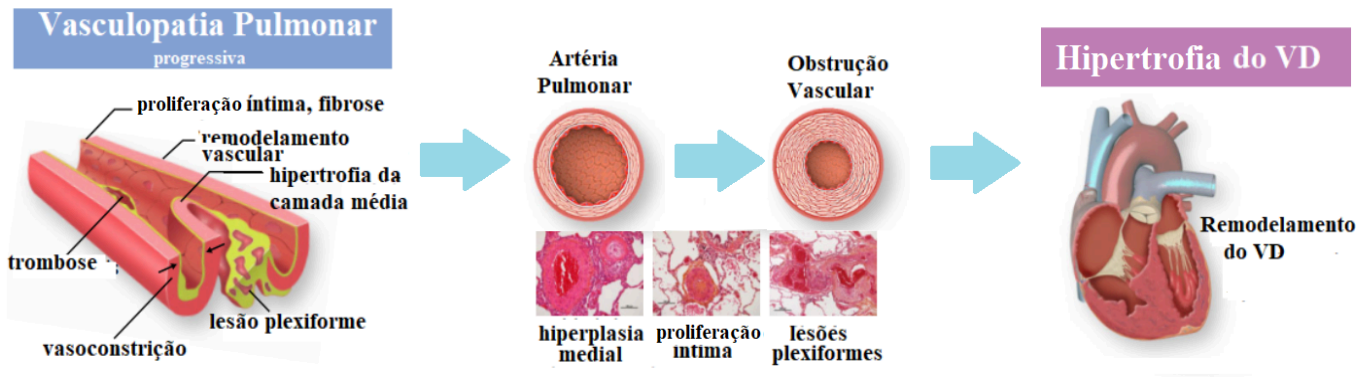


Figura 02 - Fisiopatologia da HAP. (Adaptado de HUMBERT et al., 2022).

Com o aumento da pós-carga do VD, há uma redução do débito sistólico e do débito cardíaco do VD (FROHLICH et al., 1992). Inicialmente, essas alterações são seguidas da hipertrofia concêntrica e a longo prazo hipertrofia excêntrica (dilatação) do VD e uma função contrátil anormal, gerando uma fração de ejeção reduzida e insuficiência ventricular direita (GOMEZ-ARROYO et al., 2012; OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2022). Essas alterações na estrutura cardíaca contribuem para uma redução na função de bomba do coração (HADDAD et al. 2008) como mostrado na figura 03. A progressão desses sintomas pode causar a insuficiência cardíaca direita que ocorre devido à contratilidade prejudicada do ventrículo direito (VD) causada por aumento na pressão e, posteriormente, uma sobrecarga de volume (THANDAVARAYAN et al., 2020).

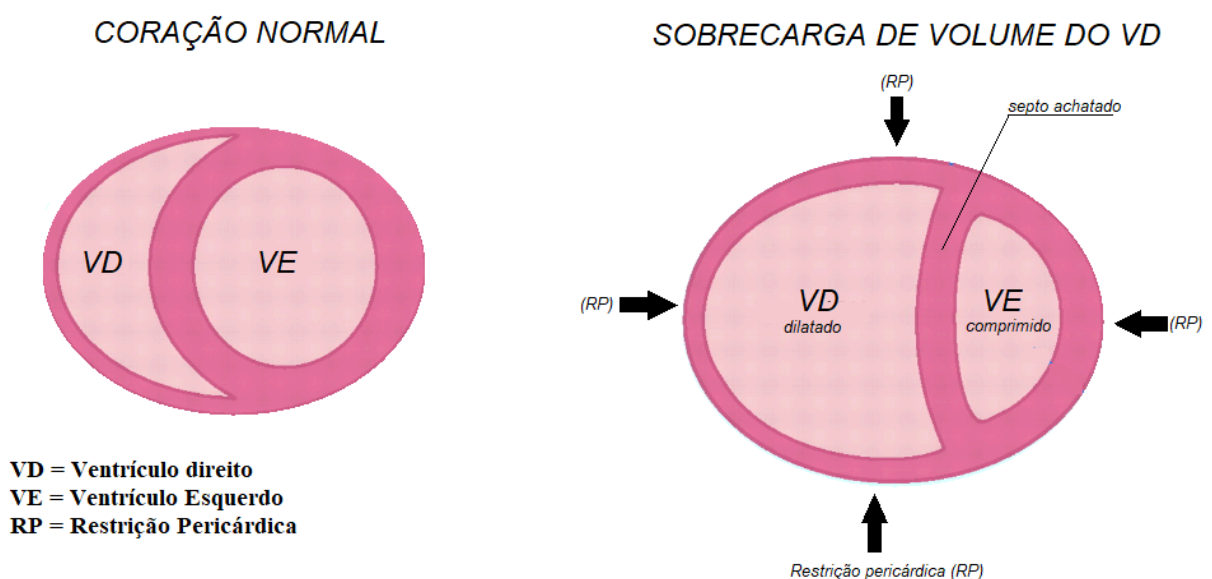


Figura 03- Comparação morfológica entre o coração normal e o coração com sobrecarga de pressão, gerando uma sobrecarga de volume no VD. (Adaptado de HADDAD et al., 2008).

Portanto, essa fisiopatologia está associada com alterações morfométricas e, conseqüentemente, fisiológicas do coração e, a longo prazo, gera uma insuficiência cardíaca direita. Segundo Tanai & Frantz (2011), às alterações hemodinâmicas estão associadas a hipertrofia ventricular, dilatação ventricular e aumento da rigidez ventricular como a diminuição do volume de ejeção e do débito cardíaco, aumento da pressão diastólica final do VD (PDFVD) e mudança no enchimento cardíaco (caracterizada por uma disfunção diastólica) e redução da fração de ejeção (caracterizada por uma disfunção sistólica), respectivamente.

1.5 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA FISIOPATOLOGIA DA HAP

1.5.1 SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO

No coração, sabe-se que a ativação do sistema nervoso simpático (SNS) causa alterações nas suas propriedades funcionais, tendo como resultado modificações no seu funcionamento, como o aumento da velocidade de despolarização diastólica, aumento da atividade do nodo sinoatrial e aumento da frequência cardíaca (aumento do cronotropismo), maior velocidade de condução (aumento na condutibilidade), aumento na capacidade de relaxamento (lusitropismo) e na força de contração do coração (inotropismo). Além disso, o SNS pode gerar vasoconstrição arterial, venoconstrição e ativar o sistema renina-angiotensina-aldosterona (IRIGOYEN et al., 2001; AYRES et al., 2016).

O sistema nervoso autônomo e o endotélio possuem a função de manter o tônus vascular, havendo um equilíbrio entre os fatores vasodilatadores do endotélio e vasoconstritores do sistema nervoso simpático (BURNSTOCK, 1990; HARRIS & MATTHEWS, 2004). O equilíbrio entre essas forças opostas é fundamental para manter o tônus vascular de forma apropriada. Nesse sentido, em relação ao fatores do endotélio e o sistema nervoso autônomo na HAP, observamos um aumento da ativação simpática que é característica da doença, isso faz com que ocorra um desequilíbrio de propriedades importantes como a produção de óxido nítrico (NO), capaz de atenuar a vasoconstrição simpática (HARRIS & MATTHEWS, 2004; LIMA-SEOLIN et al., 2017).

Um dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da HAP é a disfunção autonômica, com o predomínio do tônus simpático. Nesse contexto, uma revisão realizada por Ameri e colaboradores (2016) identificou que uma ativação persistente do SNS contribui para o

remodelamento vascular. Estes autores descrevem que a ativação simpática sobre o VD pode levar à redução da expressão e sinalização intracelular do receptor beta-adrenérgico (figura 04). Nessa perspectiva, devido a um aumento do SNS, os receptores β_1 sofrem uma redução na sua expressão, criando um sistema chamado de *down-regulation* dos receptores adrenérgicos, sendo que isto está relacionado com a gravidade da doença. Esse sistema está associado com a tentativa de promover uma proteção contra os efeitos prejudiciais da adrenalina (LOHSE et al., 2003; AMERI et al., 2016). No entanto, a ativação simpática, a longo prazo, produz efeitos danosos ao coração e aos vasos como aumento da pressão arterial, aumento da frequência cardíaca, do débito cardíaco e vasoconstrição arterial, além de acelerar a progressão da HAP (IRIGOYEN et al., 2001; TRIPOSKIADIS et al., 2009).

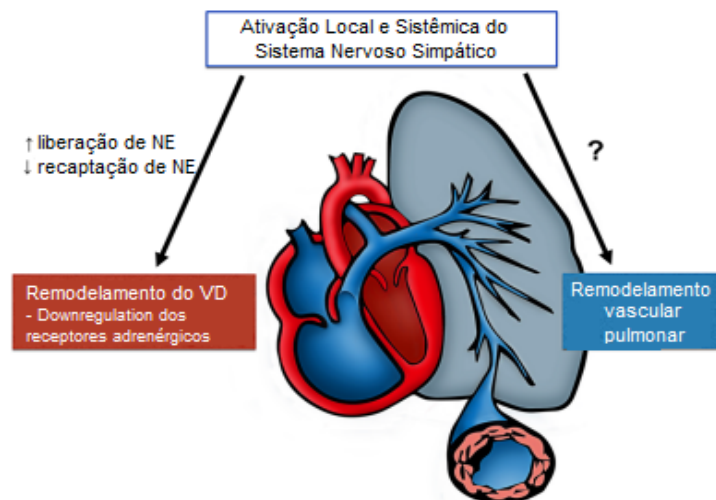


Figura 04 - Sistema nervoso simpático na hipertensão arterial pulmonar. (Adaptado de AMERI et al., 2016).

1.5.2 ESTRESSE OXIDATIVO

Outro mecanismo fisiopatológico envolvido na HAP é o estresse oxidativo. Estudos mostram que o estresse oxidativo é um fator importante na HP e nas mudanças patológicas associadas à vasculatura pulmonar e ao VD (SIES, 1997). O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e as defesas antioxidantes (SIES, 1997; ZIMMER et al. 2021; ZHANG et.al, 2023). Ademais, há uma grande variedade de espécies reativas de oxigênio (EROS), que possuem características distintas e tempo de meia vida variável. Dentre essas substâncias destacam-se o oxigênio singlet (1O_2), radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A produção de EROs ocorre através de diversas enzimas

pró-oxidantes, como a NADPH Oxidase (NOX), xantina oxidase (XO) e a eNOS desacoplada. (ZIMMER et al., 2021) .

Na HAP, com aumento de estresse oxidativo, há também um aumento da oxidação de lipídios. Esses lipídios oxidados determinam diversas alterações fisiopatológicas da HAP, tais como: alterações nas células musculares lisas causada por uma modificação na fluidez das membranas (ZIMMER et al., 2020; TAKAISHI, et al., 2021).

Zimmer et al. (2021) mostraram que, na primeira semana após a indução de um modelo de HAP, há um aumento na concentração de sulfidrilas no tecido pulmonar (que são proteínas de baixo peso molecular que possuem grupamentos tióis em sua molécula) em relação ao grupo controle, porém há uma queda na terceira semana, mostrando que as defesas antioxidantes permanecem elevadas apenas no estágio inicial da doença.

Diante disso, a redução na concentração de sulfidrilas nos vasos pulmonares, que estão envolvidas na sinalização celular redox e na defesa antioxidante pode estar associada com a fisiopatologia da HAP (THOMAS & MALLIS, 2001).

1.6 CAQUEXIA CARDÍACA

A caquexia cardíaca é uma doença prevalente em pacientes com insuficiência cardíaca. Desse modo, podemos considerar que a caquexia é uma doença multi orgânica caracterizada por sarcopenia, inflamação e índice negativo de proteínas (SADEGHI et al. 2018) e que o sistema simpático ativado pode ter um papel importante na fisiopatologia da caquexia (OKOSHI, et al. 2016).

A insuficiência cardíaca do VD, em decorrência da HAP, faz com que células imunológicas circulantes sejam ativadas, produzindo um ambiente inflamatório, iniciado por alterações morfológicas das artérias pulmonares. Evidências mostram que na HAP, os músculos esqueléticos apresentam anormalidades semelhantes a pacientes com diabetes mellitus, obesidade e síndrome metabólica, sendo justificado pela inflamação generalizada o que aumenta as concentrações de lipídios plasmáticos e insulina contribuindo para a fraqueza muscular (PAULIN & MICHELAKIS, 2014). Este efeito metabólico faz com que ocorra a redução de massa muscular esquelética, levando à diminuição da capacidade de realizar atividade física, afetando a qualidade de vida dos portadores de HAP podendo ocasionar uma intolerância ao exercício físico, e, conseqüentemente, na grande maioria dos casos, desenvolver um quadro de caquexia cardíaca (EBNER et al., 2014).

A depleção de neutrófilos diminui o remodelamento vascular e isso está associado ao processo inflamatório. Pacientes portadores da HAP possuem um quadro semelhante à síndrome metabólica, com aumento da inflamação justificado pelo meio inflamatório composto de macrófagos que são, muitas vezes, capazes de se tornarem altamente glicolíticas (TUDER et al., 1994; PAULIN & MICHELAKIS, 2014). Isso pode ter um papel importante na redução da expressão do RNA mensageiro (RNAm) do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ). Esse receptor nuclear é ativado por fator de transcrição ligante que regula o metabolismo da glicose e a adipogênese. Autores como Ameshima e colaboradores (2003) demonstraram que existem sinais e anomalias mitocondriais na HAP, sendo o RNAm mitocondrial do músculo gastrocnêmio está reduzido a partir da segunda semana após a indução do modelo da monocrotalina em ratos. Ademais, estudos utilizando uma dieta rica em lipídios em camundongos mostraram que há um aumento na quantidade de lipídeos na musculatura esquelética, um dos sinais da síndrome metabólica, e com isso há uma relação de que resistência à insulina é capaz de piorar a HAP (WEST et al., 2013).

A etiologia da caquexia cardíaca é multifatorial e o mecanismo fisiopatológico não está totalmente estabelecido (RAHMAN, et al. 2016). O diagnóstico da caquexia cardíaca em humanos pode ser feito através de uma análise antropométrica e bioquímica, como, por exemplo, a redução de 5% de peso corporal livre de edema a partir de um ano, ou um índice de massa corporal (IMC) inferior a 20 kg/m². Em pessoas com alguma doença crônica, para o diagnóstico, são observados alguns critérios de formato clínico e laboratorial, sendo eles a diminuição da força muscular, fadiga, anorexia, baixo índice de massa livre de gordura e marcadores bioquímicos alterados, como por exemplo o aumento de marcadores inflamatórios como a proteína C-reativa e interleucina - 6 (IL)-6, anemia (Hb < 12 g/dL) e baixas concentrações de albumina sérica (< 3,2 g/dL), destacados por Evans et al. (2008) e Okoshi et al. (2016).

Outro mecanismo de ação que pode estar relacionado com a caquexia cardíaca é a inflamação via TNF α , que estimula o catabolismo do músculo esquelético mediado pela ubiquitina-proteossoma que degrada proteínas através da via do fator nuclear kappa-B (NF- κ B) (BODINE et al., 2001; VUDATHA et al., 2022). O TNF α coopera com a IL-1 e Interferon γ (INF γ), que podem atravessar a barreira hemato-encefálica e induzirem alterações neuro-hormonais capazes de produzirem anorexia e perda muscular. Esses mecanismos aumentam as concentrações de serotonina disponíveis no cérebro e reduzem a secreção de hormônios estimuladores do apetite, como o neuropeptídeo Y e a grelina, que modulam o eixo

hipotálamo-hipófise-adrenal, promovendo ainda mais a degradação do músculo esquelético e do tecido adiposo (TAN et al., 2014; PORPORATO, 2016; PEIXOTO DA SILVA et al., 2020; VUDATHA et al., 2022). Consequentemente, a combinação desses fatores que incluem o aumento da proteólise, a diminuição da síntese proteica e a *up-regulation* da capacidade de produção de fibrose muscular podem contribuir para a atrofia muscular (VUDATHA et al., 2022). Ademais, alguns estudos como o de Pietzsch et al., (2020) confirmam que o TNF α ativa a via do NF- κ B, resultando em aumento da degradação proteica miocárdica através do sistema ubiquitina e aumento do estresse oxidativo.

Apesar dos mecanismos relacionados à atrofia na musculatura esquelética não estarem totalmente esclarecidos, sabe-se que a insuficiência cardíaca ocasionada pela HAP, pode aumentar o estresse oxidativo no músculo esquelético, sendo um fator determinante da caquexia cardíaca (BECKER et al., 2022). Zhang e colaboradores (2023) demonstram, através de uma revisão de literatura, que o estresse oxidativo é ativado no estágio inicial da atrofia muscular interagindo com a inflamação, disfunção mitocondrial e autofagia, aumentando a taxa de degradação proteica e contribuindo para a atrofia muscular (Figura 05). Logo, a redução do estresse oxidativo pode atenuar a perda de massa muscular. Além disso, estudo de Becker et al. (2022) em um modelo de HAP, mostrou um aumento de EROs na musculatura esquelética em ratos. Nessa prerrogativa, o mesmo estudo mostrou que há um aumento na lipoperoxidação no músculo gastrocnêmio dos grupos com HAP em relação ao grupo controle.

Nesse aspecto, em relação ao estresse oxidativo no músculo esquelético, Powers e colaboradores (2012) mostraram que o aumento de EROs produz um desequilíbrio do estado redox, levando à invasão de macrófagos e outras células de defesa, culminando em um processo de dano tecidual e, consequentemente, prejuízo funcional da fibra muscular.

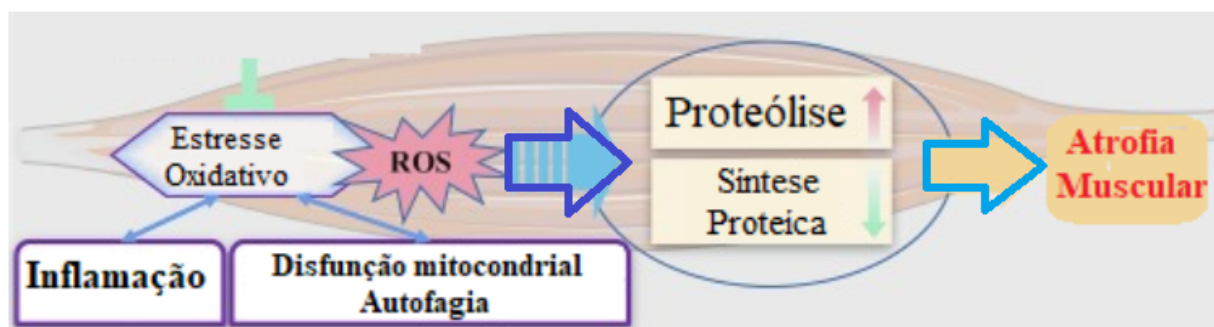


Figura 05 - Mecanismo da atrofia muscular esquelética causado pelo estresse oxidativo. (Adaptado de ZHANG et al., 2023).

Dentre os mecanismos envolvidos na caquexia cardíaca induzida por insuficiência cardíaca crônica, pode haver uma possível associação com uma maior atividade simpática e maior atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (HYLTANDER et al., 2000). O sistema simpático é conhecido como promotor da atividade adrenérgica e do aumento da atividade cardíaca, gerando uma maior carga de trabalho em animais caquéticos e também em pacientes. Consequentemente, o sistema nervoso simpático atua na caquexia por via do aumento do gasto energético que é elevado com o aumento da sua estimulação, aumentando os sintomas da caquexia cardíaca. (HYLTANDER, et al., 2000). Nesse sentido, é importante destacar que o bloqueio simpático pode reverter a caquexia independentemente do suporte nutricional, visto que sua ativação está relacionada principalmente, a aumento do gasto energético basal e ativação adicional de mediadores inflamatórios (OKOSHI et al., 2016).

Herndon et al. (2001) demonstraram que a ativação simpática pode ter influência funcional no músculo esquelético. Em doenças como a síndrome da fadiga crônica e a síndrome miastênica de Lambert Eaton mostrou-se associação entre a fraqueza muscular e a disfunção autonômica associada a insuficiência renal (O'SUILLEABHAIN P et al., 1998; VAN CAUWENBERGH et al., 2014; RODRIGUES et al., 2019). REEDS, P. J. et al. (1988) associam os receptores β no controle do conteúdo de proteínas e RNA do músculo gastrocnêmio, em ratos, e controle da perda de massa muscular total, sendo que o bloqueio desses receptores pode gerar um aumento no teor de proteínas do músculo gastrocnêmio (REEDS, P. J. et al., 1988). Nesse contexto, o aumento da ativação dos receptores β tem associação com mecanismos de ação catabólicos e o bloqueio desses receptores aumenta a deposição de proteína muscular, reduzindo a taxa de degradação proteica que pode estar associada à ativação desses receptores (PALMER et al., 1985). Desse modo, a caquexia cardíaca pode estar associada a uma ativação simpática que gera redução da secreção de leptina, exacerbando a resistência à insulina, promovendo a ativação de citocinas pró-inflamatórias, aumentando o gasto energético e, consequentemente, a degradação proteica (HRYNIEWICZ et al., 2003).

Tendo em vista que a ativação simpática contribui para a caquexia cardíaca, o betabloqueador carvedilol, pode ser uma alternativa terapêutica. Esse medicamento é classificado como um fármaco de terceira geração, capaz de agir nos receptores α_1 , β_1 e β_2 , sendo um fármaco não seletivo, possui as seguintes características: alta atividade estabilizadora de membrana, uma moderada lipossolubilidade, tempo de meia vida de 7-10 horas e ligação a proteínas de 98%, sendo de alta efetividade, além de possuir atividade antioxidante como

esquematizado na figura 06 (CHEN-SCARABELLI et al., 2012; HILAL-DANDAN & BRUNTON, 2015). Como descreveram Clark et. al. (2017), por ser um fármaco não seletivo e também com propriedades β -bloqueadoras, o carvedilol é capaz de alterar a atividade simpática na HAP. Desta forma, é plausível que o bloqueio do sistema nervoso simpático possa ter um papel importante na redução dos sintomas da caquexia cardíaca relacionados à perda de peso, diminuição da massa de gordura, perda de apetite, e evitar a redução da massa muscular (HERNDON et al., 2001)

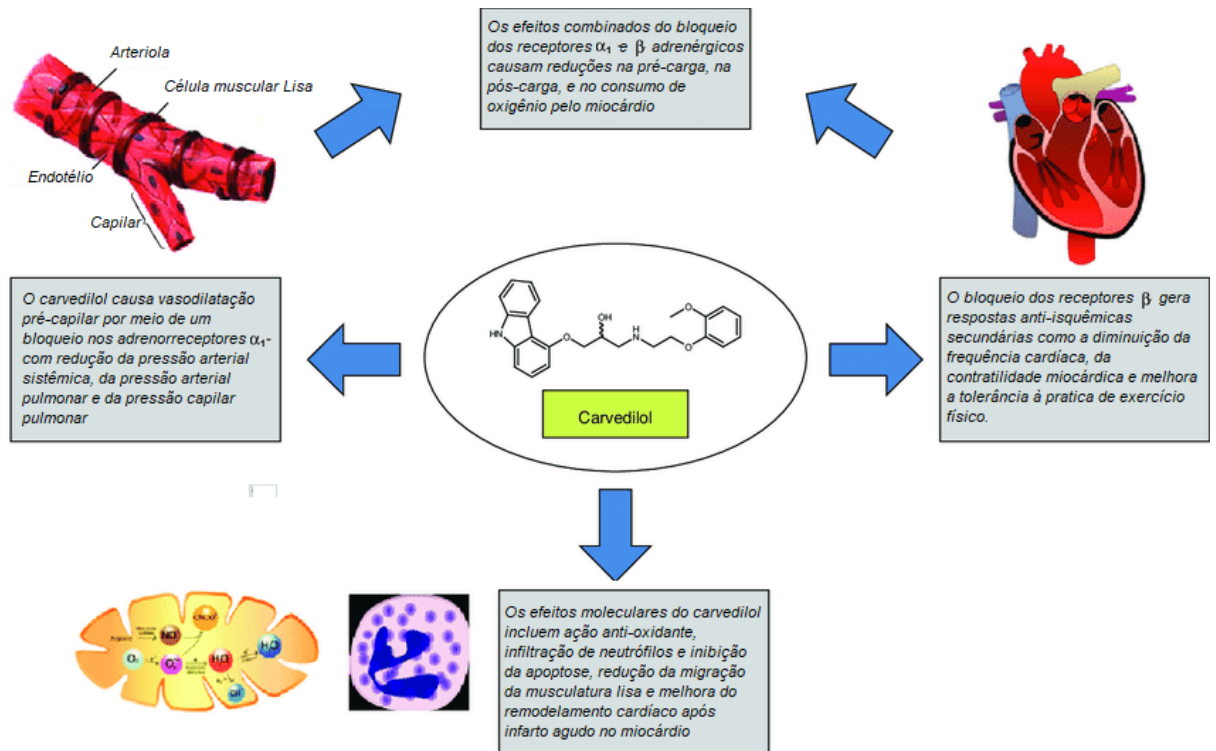


Figura 06 - Propriedades farmacológicas do carvedilol. (Adaptado de CHEN-SCARABELLI et al., 2012).

1.7 MODELO DE HAP INDUZIDO POR MONOCROTALINA

O modelo experimental de HAP por monocrotalina (MCT) é um modelo de grande reprodutibilidade dos sintomas da HAP em roedores. A MCT é um alcalóide extraído de uma planta de gênero *Crotalaria*, que pertence à família das leguminosas, como demonstrado na figura 07 (MARTINEZ et al., 2013). Segundo dados de Tokarnia e colaboradores (2000), há mais de quarenta espécies do gênero *Crotalaria* presentes em plantações de grãos e em pastagens no Brasil (TOKARNIA et al., 2000).

Nesse sentido, a MCT é uma das principais estratégias para produzir um modelo experimental de HAP em ratos Wistar, já que ele é um método simples e de baixo custo (SZTUKA & ASIŃSKA-STROSCHEIN, 2017). Sua via de ação é a partir da sua metabolização no fígado, sendo que seus metabólitos tóxicos induzem vasculite pulmonar, disfunção endotelial, aumento de vasoconstrição, remodelamento pulmonar obstrutivo, e, posteriormente, a promoção de um aumento da RVP e da pressão arterial pulmonar média (mPAP).



Figura 07- Foto das vagens, das sementes e das folhas da espécie *Crotalaria sp.* (Retirada de MARTINEZ et al., 2013).

Desse modo, ao ser aplicada, a MCT pode induzir a alterações fisiopatológicas clássicas da HP, tais como: vasculite mononuclear pulmonar e arterite pulmonar necrosante aguda, mas principalmente hipertrofia do VD (KAY JM, 1967).

Em ratos, o modelo experimental, induzido por MCT tem sido amplamente utilizado para o desenvolvimento de HAP, pois ele induz aspectos fisiopatológicos clássicos da doença como a sobrecarga de pressão no ventrículo direito, hipertrofia direita e, eventualmente, insuficiência cardíaca congestiva do VD (PAN et al., 1993). Desse modo, a progressão e o desenvolvimento deste modelo experimental estão associados ao remodelamento vascular pulmonar, caracterizado pela degeneração seguida de hiperplasia e/ou hipertrofia da camada muscular lisa, com subsequente estreitamento da luz do vaso, edema e inflamação da adventícia das artérias e veias pulmonares (MEYRICK et al., 1980; WILSON et al., 1992).

O Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFRGS é referência em utilizar esse alcalóide como indutor de HAP e tratar com terapias que podem ser observadas em uma análise pré-clínica. O trabalho de Colombo et al (2013) mostrou que os animais submetidos à MCT, possuem uma concentração elevada de EROs no pulmão, e que o exercício físico produziu resultados positivos em relação ao estresse oxidativo, reduzindo as EROs e mostrando um efeito terapêutico ao reduzir as EROs.

Em relação à função autonômica, estudo como o de Rigatto et al. (2013), utilizando o modelo da MCT, porém aplicando uma dosagem de 50 mg/kg i.p, mostrou um aumento no tônus simpático em animais submetidos à MCT e que o tratamento com aceturato de diminazeno (um ativador da conversão de angiotensina II para angiotensina 1 -7) durante 21 dias, promoveu uma redução significativa do tônus simpático em ratos tratados comparados ao grupo MCT. Posteriormente, Zimmer et al. (2020) mostraram, em um estudo temporal no modelo da MCT, que a partir da terceira semana após a aplicação da MCT, há um aumento da atividade simpática e redução na atividade parassimpática. Esses dados demonstram que há alterações no sistema autônomo dos animais que são submetidos a esse modelo. Logo, utilizar tratamentos que possam modular esse sistema pode auxiliar na compreensão dos mecanismos produzidos pela MCT em modelo pré-clínico.

2. JUSTIFICATIVA

A caquexia é uma condição incapacitante, que afeta indivíduos acometidos pela HAP. Sabe-se que a sua característica mais comum é a perda de massa muscular. Consequentemente, o uso do carvedilol pode inibir a ativação do sistema nervoso simpático, bem como melhorar o estresse oxidativo, visto que possui ação antioxidante, reduzindo a perda de massa muscular. Logo, faz-se necessário avaliar, de modo experimental, o uso desse medicamento para o tratamento da caquexia cardíaca e a perda de massa muscular.

3. HIPÓTESE

H0: O tratamento com carvedilol não previne a caquexia induzida por HAP.

H1: O tratamento com carvedilol previne a caquexia induzida por MCT por inibição do sistema nervoso simpático e redução do estresse oxidativo em ratos.

4. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a ação do carvedilol em um modelo de caquexia cardíaca induzida por MCT;

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir a HAP através da MCT;
- Confirmar a HAP através do ecocardiograma e do cateterismo do VD;
- Analisar a área das fibras musculares do sóleo e do gastrocnêmio, através da histologia, para confirmar a atrofia muscular;
- Pesar o tecido adiposo epididimal para quantificar o percentual de gordura epididimal;
- Mensurar a ingestão alimentar dos animais para quantificar o Coeficiente de Eficiência Alimentar;
- Quantificar as espécies reativas de oxigênio (EROs), lipoperoxidação (TBARS) e sulfidrilas nos músculos sóleo e gastrocnêmio;
- Aplicar o carvedilol como possível tratamento da caquexia cardíaca induzida por HAP e analisar os parâmetros supracitados.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo experimental, em ratos, que foi realizado nas dependências do laboratório de Fisiologia Cardiovascular e Espécies Reativas de Oxigênio da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Biotério Setorial do ICBS (Farmacologia)/CREAL da UFRGS, sob aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) de nº 41774.

5.1 Aspectos éticos

Este estudo foi realizado, após aprovação da CEUA da UFRGS, seguindo, de forma rígida, os cuidados especiais pré-determinados para a utilização do menor número de animais para redução da dor e sofrimento, seguindo as normas de ética para pesquisa em modelos animais. Todos os procedimentos realizados estavam de acordo com o preconizado pela Lei Arouca (lei no 11.794, de 08 de outubro de 2008), pelas diretrizes do CONCEA que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais entre outras providências, e pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

5.2 Animais

Foram utilizados 28 ratos machos Wistar, pesando aproximadamente 180 gramas, originados do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) – UFRGS, com idade aproximada de 34 dias. Os animais foram mantidos em caixas plásticas com medidas de 270 x 260 x 410 mm, totalizando 7 caixas com quatro animais por caixa. Todos os ratos foram inseridos em um ambiente com temperatura controlada (21°C), ciclo claro-escuro de 12 horas e umidade relativa de 70%.

5.3 Desenho experimental

Para a realização desse estudo, foi necessário o uso de ratos Wistar machos por 21 dias consecutivos. Os animais chegaram no biotério setorial do ICBS da UFRGS, distribuídos em caixas de forma randomizada, determinando o grupo experimental. A ração era adicionada a cada 3 dias, com controle de ingesta alimentar, sendo a água oferecida “ad libitum”. Após 72 horas de ambientação iniciou-se a indução do modelo da monocrotalina nos grupos monocrotalina (MCT) e carvedilol (MCT+C). Após o 9º dia, os animais do grupo MCT + C receberam, via gavagem, o tratamento com carvedilol, enquanto que os do grupo MCT e controle receberam, via gavagem, o diluente de carvedilol (TWEEN 20 e DMSO), ambos os

grupos por 12 dias consecutivos. Durante esse período, os ratos foram pesados diariamente e continuaram com o controle de ingesta alimentar. No 21º dia, os animais foram pesados pela última vez e submetidos às análises ecocardiográficas e cateterismo do VD. Após essas análises, os ratos foram eutanasiados por decapitação, sendo retiradas as estruturas: músculos sóleo, gastrocnêmio (para análises de estresse oxidativo e histologia) e tecido adiposo epididimal (figura 08).

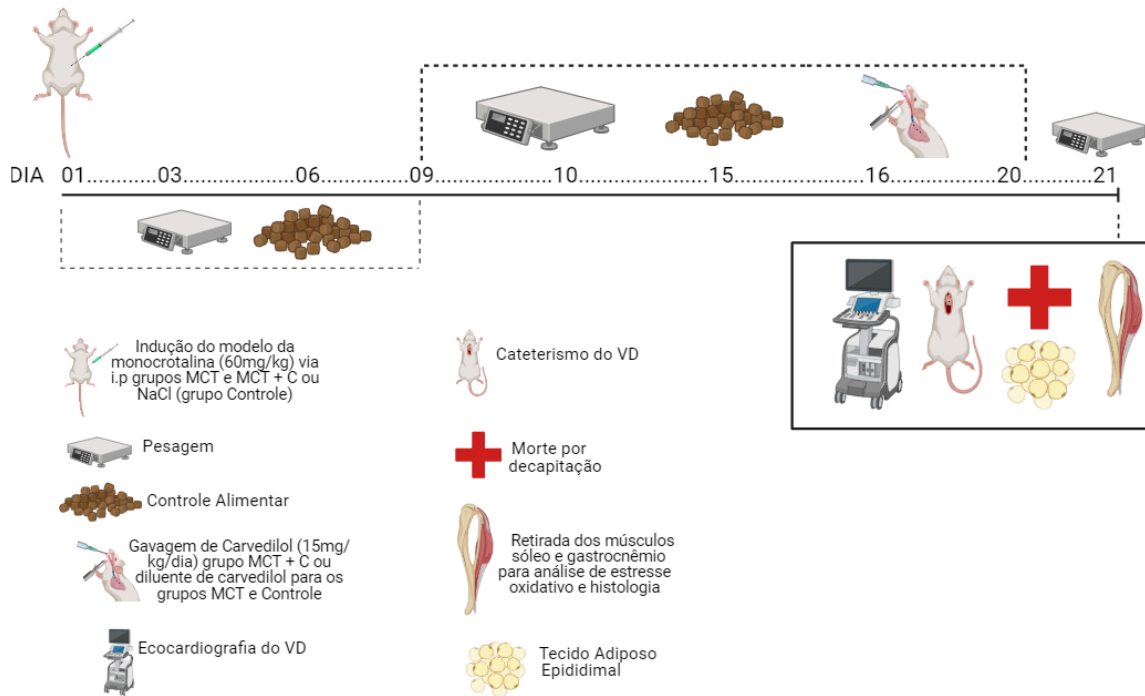


Figura 08- Desenho experimental

5.4 Grupos experimentais

Para o desenvolvimento deste estudo utilizou-se 3 grupos:

CONTROLE: Ratos que não receberam monocrotalina e sim uma dose de NaCl 0,9% (i.p) e após nove dias, diluente (TWEEN 20 e DMSO) de carvedilol por gavagem, por 12 dias consecutivos. No 21º dia do protocolo, os ratos foram eutanasiados.

MONOCROTALINA (MCT): Animais que receberam uma dose única de monocrotalina (60mg/kg i.p) e, após nove dias, diluente (TWEEN 20 e DMSO) de carvedilol, por gavagem, durante 12 dias consecutivos. No 21º dia do protocolo, os ratos foram eutanasiados.

MONOCROTALINA + CARVEDILOL (MCT+C): Animais que receberam uma dose única de monocrotalina (60 mg/kg i.p) e, após nove dias, carvedilol (15 mg/kg/dia), por gavagem, durante 12 dias consecutivos. No 21º dia do protocolo, os ratos foram eutanasiados.

5.5 Modelo de HAP induzido por monocrotalina

Os ratos MCT e MCT + C receberam uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de monocrotalina (60 mg/Kg) (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EUA). Os animais do grupo controle receberam solução salina 0,9% (pH 7,4) com o mesmo volume de aplicação (0,1% do do peso corporal em mL). A preparação foi realizada de acordo com Pichardo et al. (1999). A diluição da monocrotalina foi feita em ácido clorídrico (HCl) 1N. Após solubilizar, o pH foi ajustado até atingir 7,4 com a adição de NaOH 1N e para complementar até o volume final foi acrescentado NaCl 0,9%.

Após a administração de monocrotalina, os animais permaneceram em suas gaiolas sob condições padrão do biotério (temperatura controlada, ruído adequado, gaiolas com maravalha limpas e secas). Além disso, foram monitorados de perto para o acompanhamento dos seguintes parâmetros: desconforto, cianose, padrão de respiração anormal, perda sanguínea, reflexos lentos ou ausentes. Cabe salientar que foram tomados todos os cuidados de assepsia durante a manipulação dos animais (BORDA, 2015; ZIMMER, 2016).

5.6 Tratamento com carvedilol

O tratamento com carvedilol (SIGMA ALDRICH código: PHR1265-1G) iniciou a partir do nono dia após a aplicação da MCT, para que a HAP se instalasse, como mostrou Zimmer et al (2020). Como dosagem utilizamos 15 mg/kg/dia, durante 12 dias consecutivos de acordo com Drake e colaboradores (2013). A diluição do medicamento ocorreu em DMSO (dimetilsulfóxido) e Tween 20 (ORTIZ et al., 2019).

5.7 Mensuração da ingestão alimentar

A mensuração do cálculo de ingestão alimentar foi feita a cada 3 dias, sendo analisada a diferença entre a quantidade de alimentos oferecidos e as sobras nos comedouros (POOL, 2014). A média da diferença entre a quantidade de alimentos e as sobras foi realizada através da soma total de sobras, dividido pelo número de dias em razão do número de animais por caixa. Dessa forma, mensuramos a ingestão alimentar para detectar a presença de anorexia. Para tanto, os dados da ingestão alimentar durante o uso das rações para o cálculo do Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) foi de acordo com a equação: $CEA = \text{ganho de peso (g)} / \text{quantidade ingerida de alimentos (g)}$ (DE MELO-ROCHA, 2020).

5.8 Avaliação ecocardiográfica

A avaliação da ecocardiografia foi realizada no vigésimo primeiro dia. Para isto, os animais foram submetidos à anestesia com quetamina (90 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.). As imagens foram obtidas através do modo bidimensional, modo M e do doppler pulsado (Sistema de Ultrassom Philips HD7; Andover, MA, USA), utilizando um transdutor piezoelétrico setorial S12-4 (Philips; Andover, MA, USA). Foram avaliados a RVP, através da relação entre o tempo de aceleração e o tempo de ejeção do fluxo através da artéria pulmonar (AT/ET) e os seguintes parâmetros de função sistólica: volume sistólico e excursão sistólica do plano anular da tricúspide (TAPSE), diâmetro sistólico do VD. Como parâmetros de função diastólica foram medidos: a razão entre o enchimento ventricular e a sístole atrial (E/A) e diâmetro diastólico do VD (LIMA-SEOLIN et al., 2017; TÜRCK et al., 2020).

5.9 Avaliação hemodinâmica: cateterismo do VD

Para a realização do cateterismo do VD, o rato foi posicionado na prancha operatória sob anestesia e, para a realização do cateterismo, ocorreu o isolamento e canulação da veia jugular direita com um tubo de polietileno PE-50, sendo ele introduzido até o VD. Esses cateteres estavam conectados a um transdutor de pressão em um sistema de registros WINDAQ software (DATAQ Akron, Ohio 44333 U.S.A), monitorando a pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD) e pressão diastólica final do ventrículo direito (PDFVD), a frequência cardíaca (FC), o índice de relaxamento (dp/dt_{\min}) e o índice de contratilidade (dp/dt_{\max}), que foram obtidos a partir dos registros da onda de pressão ventricular direita e detecção de pontos máximos e mínimos de cada ciclo cardíaco. Para estimar a mPAP, foi utilizada a fórmula: $mPAP \text{ (mmHg)} = 0,61 \times PAP + 2$, nesse caso, substituímos a pressão sistólica na artéria pulmonar (PAP) pela PSVD, pois sabe-se que são semelhantes (SOUZA-RABBO et al., 2008; LIMA-SEOLIN et al., 2017; ZIMMER et al. 2020; TÜRCK et al., 2020.).

5.10 Morte dos ratos e retirada das estruturas

A morte dos animais foi através da decapitação por guilhotina de acordo com as normas exigidas pela CONCEA, sendo ela realizada em um ambiente separado dos outros animais e por um pesquisador com experiência. Os animais foram anestesiados com o uso de quetamina e xilazina, com 3x a dosagem inicial, sendo administrada via intraperitoneal. Após a eutanásia, foi feita a retirada e limpeza dos músculos sóleo e gastrocnêmio, e retirada do tecido adiposo epididimal.

5.11 Análise da quantidade de tecido adiposo epididimal

A quantidade de tecido adiposo epididimal foi pesada em gramas (DE MELO ROCHA, 2020). Após isso, realizamos o cálculo de índice de gordura epididimal (IGE) que foi determinado pela razão entre o peso da gordura epididimal (GE) e o peso corporal final (PCF) do rato, multiplicado por 100, sendo expresso em porcentagem. Equação: $IGE = (GE/PCF) \times 100$ (DE MELO ROCHA, 2020).

5.12 Análise histológica

Para análise histológica, os músculos sóleo e gastrocnêmio direitos foram retirados e cortados em planos horizontais e transversais, respectivamente. Estes músculos foram imersos em formalina 10%, processados em concentrações crescentes de álcool e xilol e parafinizados em paraplast Plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Os músculos já em parafina foram cortados com 4 mm de espessura, fixados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (HE) (STEFANON et al., 2013; ZIMMER et al., 2020). Após isso, foram feitas fotografias das lâminas de HE, que estavam em um aumento microscópico de 40x e, posteriormente, foi quantificada a média da área de 50 fibras musculares por lâmina, utilizando o programa IMAGEJ disponível em (<https://imagej.net/ij/download.html>).

5.13 Homogeneização de tecidos

Amostras de tecido sóleo e gastrocnêmio do lado esquerdo foram pesadas, cortadas em tiras menores e acrescentado em um eppendorf. Após isso, para cada 1 grama de músculo, acrescentou-se 5 mL de KCl (1,15%), 10 µL de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e foi adicionado 15 µL de Triton 10% para cada 1g de músculo, estabelecendo o protocolo de homogeneização de músculo esquelético. Após, os músculos foram homogeneizados por 30 segundos em Ultra-Turrax, seguindo a essa etapa o protocolo de Llesuy et al (1985). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 3000 rpm por um tempo de 20 minutos em uma temperatura de 4°C. Com as amostras centrifugadas, o sobrenadante foi retirado e armazenado em um freezer para análises bioquímicas futuras.

5.14 Estresse Oxidativo

5.14.1 Concentração total de espécies reativas de oxigênio

A determinação da concentração total de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi realizada utilizando a técnica descrita por Lebel e colaboradores (1992). Esta técnica mensura a concentração de EROs através da interação entre estas e o diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, EUA), que é oxidado e transformado em

2,7-diclorofluoresceína (DCF), molécula que emite fluorescência. Para isto, as amostras foram incubadas com tampão fosfato 20 mM mais KCl (cloreto de potássio) 140 mM (pH 7,4) e DCFH-DA 100 μ M por 30 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. A reação foi medida em espectrofotômetro fluorescente (T80 UV/VIS Spectrometer, PG Instruments, São Paulo, BR), no qual as amostras foram excitadas a 488 nm e a emissão de fluorescência foi coletada a 525 nm. Os resultados foram expressos em nmoles de DCF formado/mg proteína.

5.14.2 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O TBARS foi medido conforme descrito anteriormente (BUEGE & AUST, 1978). Neste método, o ácido tiobarbitúrico (TBA) reage com os produtos da peroxidação lipídica, produzindo um composto que é medido a 535 nm. Os resultados dos TBARS foram expressos como nmol/mg de proteína.

5.14.3 Conteúdo de sulfidrilas

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

5.15 Descarte de resíduos

O descarte de resíduos não tóxicos ocorreu no sistema de esgoto comum e os demais resíduos foram encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para procedimento correto de eliminação. Os resíduos biológicos foram descartados no lixo de cor branca. As carcaças dos animais mortos foram levadas ao freezer de descartes biológicos, onde foram recolhidas por uma empresa terceirizada, responsável pelo serviço de coleta de materiais biológicos.

5.16 Análise estatística

Para análise estatística, foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A comparação entre os grupos foi feita por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida de

teste complementar de Student–Newman–Keuls (SNK). As diferenças foram consideradas significativas quando as análises estatísticas apresentaram um valor de $P < 0,05$. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. O software SPSS 20.0 para Windows foi utilizado como ferramenta computacional para análise estatística dos dados, e o software GraphPad Prism, versão 5.0 para Windows para a elaboração dos gráficos.

7. DISCUSSÃO:

O presente estudo mostrou que há um aumento no estresse oxidativo nos músculos sóleo e gastrocnêmio, redução na área média e no peso da fibra muscular do músculo sóleo dos animais submetidos ao modelo da HAP, sugerindo o desenvolvimento da caquexia cardíaca. Além disso, o nosso estudo mostrou que o tratamento com 12 dias de carvedilol reduziu as EROs e a lipoperoxidação, tanto no músculo sóleo quanto no músculo gastrocnêmio, além de melhorar parâmetros hemodinâmicos relacionados ao VD.

A HAP é caracterizada, inicialmente, por vasoconstrição das arteríolas pulmonares que promove aumento da RVP e, conseqüentemente, gera o remodelamento do VD. Em nosso estudo, utilizamos o modelo da monocrotalina, que é um modelo barato, de fácil manejo e de grande reprodutibilidade dos sinais da HAP (POLONIO et al., 2012; LIMA-SEOLIN et al., 2020; BECKER et al., 2022). O estabelecimento do modelo, já padronizado em ratos da linhagem Wistar, foi confirmado através dos resultados ecocardiográficos. Observamos que, 21 dias após a indução da monocrotalina, houve redução da razão AT/ET, o que denota uma maior dificuldade da ejeção ventricular direita. Este parâmetro é utilizado para estimar a resistência dos vasos pulmonares e sua redução sugere aumento da pós-carga ao ventrículo direito (AYRES, 2016). Esse aumento da resistência vascular pulmonar pode ser devido ao espessamento da camada média da parede arteriolar e também da camada adventícia, provocada por processo inflamatório, culminando com vasoconstrição, característica da doença (WILSON et al., 1992).

Além disso, observamos que os nossos resultados de parâmetros sistólicos, responsáveis por mostrar como está a função contrátil do coração, estão prejudicados. Estes dados vão ao encontro da literatura, mostrando que há uma redução no VS, na TAPSE (parâmetro mais utilizado em humanos, capaz de determinar a variação do diâmetro longitudinal das fibras do VD) (HANDOKO, M. L. et al., 2009; BOGAARD et al., 2010), justificando a dificuldade do ventrículo em ejetar por conta da pós-carga aumentada. Esses resultados são semelhantes aos dados de Türck et al. (2018) que também utilizaram esse modelo de HAP (TÜRCK et al., 2018). Outro achado que justifica a confirmação do modelo da HAP em nosso estudo é o DsVD, que corresponde à dimensão interna mínima atingida no VD

ao final da ejeção. O aumento deste parâmetro significa perda de capacidade contrátil, uma vez que, durante a sístole, não há uma redução dos diâmetros ventriculares de forma adequada. Em relação à atuação do carvedilol, observamos que ele não atenuou a perda de função sistólica. Alguns desses dados são antagônicos aos resultados de Okumura et al. (2015), em um estudo que investigou o efeito do carvedilol (15 mg/kg) sobre a fibrose ventricular no modelo da monocrotalina (60 mg/kg) em ratos da linhagem Sprague-Dawley, com tratamento de 5 semanas. Este estudo mostrou que os parâmetros sistólicos do VD como a TAPSE e o VS foram modulados pelo carvedilol. Tais resultados podem ser comparados por possuírem modelo e tratamento semelhantes; entretanto, o protocolo utilizado neste trabalho segue a metodologia utilizada por Zimmer et al. (2020). Nesse estudo temporal com o modelo da monocrotalina em ratos Wistar, mostrou-se que, após a terceira semana da indução do modelo, a taxa de sobrevivência reduzia drasticamente, chegando no vigésimo oitavo dia com uma taxa de 100% de mortalidade. Desse modo, após estabelecermos que o modelo deveria ser seguido por 21 dias, para evitar queda na taxa de sobrevivência, iniciamos o tratamento com o carvedilol a partir do nono dia, totalizando 12 dias de tratamento, seguindo o protocolo de tempo de tratamento com carvedilol de Ortiz et al. (2019), que utilizou o modelo de infarto do miocárdio. Deixamos o modelo seguir por nove dias, visto que em um estudo anterior com esse este período, já passou o pico do processo inflamatório e a sinalização para o remodelamento do ventrículo direito já se estabeleceu (ZIMMER et al., 2020). O tempo de tratamento com carvedilol no nosso estudo foi menor do que o do estudo de Okumura et al. (2015), podendo ser uma justificativa para nossos resultados ecocardiográficos. Nos parâmetros diastólicos, observamos que há uma redução na razão E/A e o aumento do DdVD. Estes dados sugerem que há mais volume residual no ventrículo direito (VD) dos ratos com HAP, devido à insuficiência da função diastólica associada ao modelo, como no trabalho de Türk et al. (2018), indicando uma hipertrofia excêntrica que terá como consequência um aumento no volume residual. Entretanto, observamos que o carvedilol reduziu o DdVD, de forma significativa em relação ao grupo monocrotalina. Este achado sugere que o uso do carvedilol reduziu a pós-carga ao VD, o que poderia justificar um menor volume residual nesta câmara cardíaca.

Em relação ao cateterismo do VD, observamos que não há diferenças na FC dos ratos submetidos ao modelo. Tais resultados são semelhantes aos dados de Lima-Seolin et al. (2017), utilizando um betabloqueador bucindolol, mostrando que o modelo não foi capaz de modificar a FC entre os grupos. Em relação ao tratamento com carvedilol não observamos diferença

significativa. Isso significa que o carvedilol não foi capaz de modificar a função cronotrópica nesse modelo da HAP. Um dos motivos responsáveis por este resultado pode ser o tempo de tratamento com carvedilol. Todavia, esse resultado é diferente do encontrado no estudo de Okumura et al. (2015), onde há redução significativa da FC no grupo tratado com carvedilol (15 mg/kg) por 5 semanas em relação ao grupo monocrotalina, justificando mais uma vez que o tempo de tratamento pode ter interferência nesse resultado. Outro dado do presente estudo é o aumento da PSVD e da PDFVD. A pressão sistólica aumentada se deve ao aumento da pós-carga, sendo que o VD necessita desenvolver mais força para conseguir ejetar, conforme demonstrado em estudos anteriores utilizando o modelo da monocrotalina (BOGAARD et al., 2010; OKUMURA et al., 2015; LIMA-SEOLIN et al., 2017; ORTIZ et al., 2019; ZIMMER et al., 2020). O aumento da pressão diastólica final do VD pode estar associado à pressão imposta pelo volume residual na câmara cardíaca. Observamos que o carvedilol reduziu de forma significativa essas pressões. Estes dados sugerem que o bloqueio β -adrenérgico tem um impacto na redução da pós-carga, reduzindo a força gerada no miocárdio para a contração do músculo cardíaco, corroborando nossos achados ecocardiográficos. Este resultado é semelhante aos dados de Okumura et al. (2015) e Lima-Seolin et al. (2017). A partir dos dados de pressão sistólica, calculamos a mPAP e observamos que há um aumento da pressão arterial pulmonar média, resultado também encontrado por Corssac et al. (2021). Outrossim, observamos que o carvedilol é capaz de reduzir de forma significativa a mPAP de ratos submetidos ao modelo da monocrotalina, o que sugere redução da pós-carga imposta ao VD. Os dados de dp/dt mínima e dp/dt máxima, que mostram a velocidade de contração e relaxamento do VD, mostraram aumento nos ratos submetidos à monocrotalina em relação ao grupo controle, sendo semelhante dos resultados já encontrados na literatura (TÜRCK et al., 2018). Todavia, não observamos efeitos significativos do carvedilol nesses parâmetros, sendo diferentes dos resultados encontrados no estudo de Okumura et al. (2015), que observaram aumento significativo desses parâmetros tanto em relação ao grupo controle, quanto em relação aos ratos submetidos ao modelo de HAP. Tendo em vista que o carvedilol não alterou estes índices relativos ao inotropismo e lusitropismo, parece que sua ação ocorreu mais ao nível vascular, aumentando a complacência dos vasos e, conseqüentemente, tendo um impacto mais significativo apenas na pós-carga do VD.

Um dos objetivos deste estudo foi verificar o impacto das alterações ecocardiográficas e hemodinâmicas ocorridas no modelo da monocrotalina na musculatura esquelética destes

animais. Há relatos na literatura de que este modelo induz caquexia cardíaca (MOLINARI et al., 2016).

A caquexia cardíaca, em humanos, tem sido definida como uma perda maior de 5% da massa corporal em pacientes com doença crônica e, pelo menos, três dos seguintes critérios clínicos e laboratoriais: diminuição da força muscular, fadiga, anorexia, baixo índice de massa livre de gordura e bioquímica anormal (OKOSHI et al., 2016). Ademais, ela é uma condição patológica comum em pacientes com insuficiência cardíaca e sua ocorrência gera redução da sobrevida e alterações funcionais como redução na fração de ejeção e capacidade de realização de atividade física (ROSSIGNOL et al., 2015). No estudo de Molinari et al. (2016) os autores observaram que os animais continuam ganhando peso corporal até a terceira semana após a indução do modelo. Entretanto, além dos achados macroscópicos associados ao peso de estruturas corporais como os músculos esqueléticos, é necessário realizar avaliações bioquímicas e histológicas para confirmar a caquexia (BERTAGLIA et al., 2011). Em relação aos dados morfométricos, nosso estudo mostrou que os ratos submetidos ao modelo da monocrotalina reduziram o peso corporal em relação ao grupo controle, dados que são semelhantes ao estudo de Zimmer et al. (2020). Todavia, não observamos diferença significativa no grupo carvedilol em relação ao grupo monocrotalina, resultado diferente dos dados de Okumura et al. (2015) que identificaram que o carvedilol, durante 3 semanas de tratamento, atenua de forma significativa, a redução do peso corporal em ratos de linhagens diferentes ao que utilizamos, porém com o mesmo modelo de HAP. Em relação ao peso muscular, observamos diferença significativa no peso do músculo sóleo, mostrando uma característica de caquexia muscular nesse modelo. Este resultado é semelhante ao encontrado por Bertaglia et al. (2011), que utilizaram o modelo da monocrotalina (30 mg/kg) para insuficiência cardíaca, durante 22 dias, com ratos com peso médio de 100g. Os resultados desses autores mostram que os ratos insuficientes possuem uma redução no peso muscular do músculo sóleo/peso corporal. Tais resultados mostram que o peso do músculo sóleo reduz com o modelo da monocrotalina. No que corresponde à área da fibra muscular avaliada pela histologia, nossos dados mostram que o músculo sóleo dos animais submetidos ao modelo possuem uma redução da mesma em relação ao grupo controle. Em relação ao músculo gastrocnêmio, não observamos diferença no peso e na área da fibra muscular. Estes dados estão em concordância com os de Bertaglia et al. (2011), que mostraram atrofia muscular do sóleo. Autores como Vescovo et al. (1998) também mostraram que há atrofia do músculo sóleo no modelo da monocrotalina (30 mg/kg), em ratos Sprague-Dawley. Nessa perspectiva, os mesmos autores descrevem que essa redução na área da

fibra não é devida à falta de atividade física (característica da caquexia cardíaca), mas há mecanismos neuro-hormonais, citocinas como TNF- α , resistência à insulina que podem estar relacionados à redução da área da fibra muscular, uma perspectiva para o nosso estudo seria avaliar tais parâmetros. Foi demonstrado que a insuficiência cardíaca congestiva pode levar ao desenvolvimento de miopatia, caracterizada por atrofia e mudança das fibras do tipo lento para o rápido na musculatura esquelética dos membros inferiores de ratos no modelo da monocrotalina (VESCOVO et al.,1998). Isto pode ser devido ao fato de que as concentrações de RNAm que de codificam cadeias pesadas de miosina do tipo oxidativa estão reduzidas, enquanto as concentrações de RNAm que codificam as cadeias pesadas de miosina do tipo glicolítica estão aumentadas no modelo da monocrotalina (VESCOVO et al.,1998). Essas alterações podem ter um papel importante na atrofia muscular associada à insuficiência cardíaca. No nosso estudo, foram utilizados dois tipos de músculo esquelético: o sóleo que possui mais fibras oxidativas (lentas) e o gastrocnêmio que possui fibras glicolíticas (rápidas) (VESCOVO et al.,1998; CALORE et al. 2002; TABOROWSKA, et al., 2016). Na HAP, ocorrem alterações metabólicas no sentido de favorecer a via glicolítica em detrimento da fosforilação oxidativa; alteração conhecida como efeito Warburg (PAULIN & MICHELAKIS, 2014). É plausível supor que este desvio metabólico possa explicar a alteração diferencial no músculo sóleo, em relação ao gastrocnêmio, observada neste estudo. Outrossim, nosso estudo mostrou que o carvedilol não alterou os parâmetros de peso e área da fibra muscular, não possuindo associação do uso de betabloqueador com a caquexia durante período de tratamento de 12 dias. Todavia, estudos clínicos como o de Clark et al. (2017) mostram que o carvedilol (dose final de 25 mg/dia) durante 2 meses, promove uma reversão parcial da caquexia em pacientes com insuficiência cardíaca, podendo a perda de peso estar relacionada com um possível bloqueio da ativação simpática. Isso pode ser explicado porque pacientes com insuficiência cardíaca apresentam uma maior ativação simpática e há uma quantidade de noradrenalina circulante ainda maior quando há perda de massa muscular. Consequentemente, a ativação simpática pode exacerbar a resistência à insulina e promover liberação de citocinas pró-inflamatórias e todas essas associações são capazes de levar a uma perda de tecido adiposo e células musculares (BURNISTON et al., 2002; TAN, LIP-BUN et al., 2003; CLARK et al., 2017).

Outra análise importante realizada no nosso estudo para comprovar o quadro de caquexia foi a ingestão alimentar, uma vez que a anorexia é um sinal característico da doença e é um achado comum em pacientes com caquexia cardíaca. Dessa forma, em relação à ingestão alimentar,

observamos que os animais submetidos ao modelo comeram em média menos ração diariamente do que os animais do grupo controle. Além disso, mostramos que o carvedilol não modificou os parâmetros de ingestão alimentar. Esse resultado difere dos dados encontrados por Farhat et al. (2019) que mostraram, em um modelo de hipoglicemia associada à insuficiência autonômica, que o carvedilol (3 mg/kg) é capaz de melhorar a ingestão alimentar de ratos com caquexia. Outro parâmetro analisado foi a quantidade de tecido adiposo epididimal, um importante indicador de gordura corporal, reconhecido por ser um tecido adiposo mais ativo devido à maior sensibilidade à lipólise, sendo associado com a questão inflamatória que é comum na caquexia cardíaca (GAROFALO et al., 1996; HERMSDORFF & MONTEIRO, 2004). Em nossos resultados, observamos que há uma redução na quantidade de tecido adiposo epididimal dos animais submetidos ao modelo da monocrotalina. Além disso, verificamos que o carvedilol não reverteu este efeito. Em relação ao índice de gordura epididimal, não observamos alterações entre os grupos.

Um dos mecanismos envolvidos na gênese da caquexia cardíaca é o estresse oxidativo (VUDATHA et al., 2022). Em relação ao estresse oxidativo, sabe-se que seu aumento é o resultado de um desequilíbrio entre a produção de EROs e sua estabilização por mecanismos antioxidantes, como as sulfidrilas, que são antioxidantes não-enzimáticos. O aumento de EROs pode gerar uma ativação de vias proteolíticas como a via da ubiquitina. Além disso, a aumentada concentração de EROs também pode levar a danos ao DNA mitocondrial, impactando negativamente a cadeia de transporte de elétrons, acumulando, assim, mais EROs (LEE et al., 2021; VUDATHA et al., 2022). Nossos resultados mostram que os animais que receberam apenas a monocrotalina possuem uma maior concentração de EROs nos músculos sóleo e gastrocnêmio em relação ao grupo controle, sugerindo um aumento no estresse oxidativo. Em relação ao músculo gastrocnêmio, nossos resultados estão de acordo com os dados encontrados no estudo de Becker et al. (2022), que utilizando o mesmo protocolo, porém como intervenção o exercício físico, mostrou que a concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no músculo gastrocnêmio nos animais com HAP, está aumentada em relação ao grupo controle. Em relação ao tratamento com 12 dias de carvedilol, observamos que esse medicamento, por possuir propriedades antioxidantes, foi capaz de reduzir as concentrações de EROs na musculatura esquelética em relação ao grupo monocrotalina. Isso pode ser explicado pela estrutura química do fármaco, composto por grupamento carbazol, que possui propriedades antioxidantes, atuando sobre o controle dos radicais livres (RUFFOLO & FEUERSTEIN, 1997). Em relação à lipoperoxidação, os nossos resultados mostram um

aumento de TBARS nos músculos sóleo e gastrocnêmio, nos animais que receberam apenas a monocrotalina. Este resultado também foi observado no estudo de Becker et al. (2022), que analisou a lipoperoxidação no músculo gastrocnêmio, demonstrando aumento nestas concentrações. Em relação ao músculo sóleo, nossos resultados estão de acordo com os dados de Bertaglia et al. (2011), que observaram que o modelo da monocrotalina aumentou a lipoperoxidação, sugerindo um dano lipídico relacionado à HAP, que pode estar envolvido na caquexia cardíaca. Em relação ao carvedilol, observamos um resultado positivo na redução da lipoperoxidação, tanto do músculo sóleo, quanto do músculo gastrocnêmio, mostrando que o medicamento possui a capacidade de reduzir o dano oxidativo. Em relação às sulfidrilas, não observamos diferença significativa nos músculos sóleo e gastrocnêmio em nenhum dos grupos. Tais resultados ainda não foram demonstrados na literatura na musculatura esquelética no modelo da monocrotalina. Entretanto, sabe-se que, no modelo da monocrotalina, em uma análise temporal, realizada por Zimmer et al. (2021), na primeira semana após a indução do modelo, a concentração de sulfidrilas no tecido pulmonar está reduzida. Na segunda semana, as sulfidrilas estão aumentadas; porém, estas não se mostraram diferentes em relação ao grupo controle na terceira semana. Este estudo avaliou a concentração de sulfidrilas no tecido pulmonar, sendo importante avaliar essas concentrações, de forma temporal, também no tecido esquelético. Porém, nosso estudo sugere que, neste tempo de estudo (21 dias), as alterações do estado redox se devem mais à produção de EROs do que à redução dos antioxidantes não-enzimáticos.

Em suma, podemos destacar que há uma associação do estresse oxidativo no músculo esquelético com a caquexia cardíaca. No entanto, não podemos estabelecer uma relação de causa e efeito entre esses fenômenos. É possível que haja o envolvimento de outros mecanismos não explorados neste estudo, como a inflamação, com a ação de citocinas como TNF α e IL-6. Sabe-se que estas citocinas estão aumentadas em modelo de caquexia, já que o TNF α ativa a via do NF- κ B, o que gera um aumento do estresse oxidativo, podendo ter uma importante associação entre o estresse oxidativo e os mecanismos inflamatórios (LLOVERA et al., 1993; PIETZSCH et al., 2020; VUDATHA et al., 2022). Todavia, os mecanismos associados à atrofia do músculo esquelético não foram totalmente esclarecidos, sendo importante avaliar uma combinação de fatores, incluindo aumento da proteólise, diminuição da síntese proteica e fibrose no tecido muscular (ZHANG et al., 2023). Ademais, a ativação neuro-hormonal também pode estar associada com a atrofia do músculo esquelético relacionada à insuficiência cardíaca crônica, de acordo com a hipótese neuro-hormonal pois as

concentrações da noradrenalina podem refletir a atividade simpática e tanto a noradrenalina quanto a adrenalina podem causar uma mudança catabólica. Também, a angiotensina II pode causar anorexia e redução das concentrações circulantes do fator de crescimento semelhantes à insulina (IGF-1) estando relacionadas à caquexia do músculo esquelético (BRINK et al., 1996; ANKER & SHARMA, 2002; OKOSHI et al., 2016). Sendo assim, a ativação simpática está associada com a caquexia cardíaca (OKOSHI et al., 2016). Outro possível mecanismo envolvido é o balanço entre síntese e degradação proteica, o qual pode ser analisado através da expressão de proteínas como a Muscle RING-Finger Protein-1 (MURF-1) e a atrogina-1. É sabido que, de forma específica, a MURF-1 está relacionada à perda de massa muscular, sendo um importante fator para a confirmação do modelo de caquexia cardíaca (ADAMS et al., 2007). Portanto, destacamos a importância de novos estudos sobre essa temática para compreender a atuação do bloqueio do sistema nervoso simpático e o balanço simpato-vagal, visto que este sistema possui um importante papel na fisiopatologia da HAP e também em outros fatores como metabolismo, estresse oxidativo e inflamação, que são características importantes da fisiopatologia dessa doença.

Uma das limitações que consideramos importantes neste estudo foi a falta da confirmação do bloqueio autonômico com o uso do carvedilol, através da análise espectral. Também poderiam ser avaliados parâmetros metabólicos, tendo em vista que uma das explicações para o surgimento da caquexia cardíaca na HAP são alterações metabólicas.

8. CONCLUSÃO:

Os resultados do nosso estudo nos mostram que:

- Houve indução da HAP pelo modelo da monocrotalina, sendo esta confirmada pelos resultados da ecocardiografia e cateterismo do VD.
- O carvedilol não modificou os parâmetros ecocardiográficos, exceto o DdVD, sugerindo que o medicamento é capaz de reduzir a pós-carga.
- Em relação às mudanças hemodinâmicas, o carvedilol não alterou a frequência cardíaca, porém melhorou os parâmetros de PDFVD, PSVD e mPAP. Esses resultados indicam melhora na função hemodinâmica com o uso deste betabloqueador.
- Os resultados morfométricos mostram que o modelo da monocrotalina induz sinais característicos de caquexia cardíaca; porém, não observamos alterações promovidas pelo carvedilol.
- No estresse oxidativo, nosso estudo mostrou que há um aumento na concentração de EROs e TBARS nos músculos sóleo e gastrocnêmio e que, neste modelo, o tratamento com carvedilol reduz esses parâmetros. Em relação às sulfidrilas, não observamos resultados significativos.
- Em suma, nosso estudo mostrou que o carvedilol não foi capaz de prevenir a caquexia cardíaca, porém ele possui a capacidade de modificar aspectos importantes como a hemodinâmica do VD e o estresse oxidativo nos músculos sóleo e gastrocnêmio.

- ADAMS, Volker et al. Myocardial expression of Murf-1 and MAFbx after induction of chronic heart failure: effect on myocardial contractility. **Cardiovascular Research**, v. 73, n. 1, p. 120-129, 2007.
- AKSENOV, Michael Y.; MARKESBERY, William R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, n. 2-3, p. 141-145, 2001.
- AL-QADI, Mazen et al. Epidemiology, pathogenesis, and clinical approach in group 5 pulmonary hypertension. **Frontiers in Medicine**, v. 7, p. 616720, 2021.
- ALVES, Christiano Robles Rodrigues et al. Aerobic exercise training as therapy for cardiac and cancer cachexia. **Life Sciences**, v. 125, p. 9-14, 2015.
- ALVES JR, Jose Leonidas et al. Pulmonary arterial hypertension in the southern hemisphere. **Chest**, v. 147, n. 2, p. 495-501, 2015.
- AMESHIMA, Shingo et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) expression is decreased in pulmonary hypertension and affects endothelial cell growth. **Circulation Research**, v. 92, n. 10, p. 1162-1169, 2003.
- ANKER, Stefan D.; SHARMA, Rakesh. The syndrome of cardiac cachexia. **International journal of Cardiology**, v. 85, n. 1, p. 51-66, 2002.
- AUSTIN, Eric D. et al. Gender, sex hormones and pulmonary hypertension. **Pulmonary Circulation**, v. 3, n. 2, p. 294-314, 2013.
- AYRES, M. de M. Fisiologia. 4^o edição. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2013.
- BECKER, C. U. et al. 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, 2022.
- BERTAGLIA, Raquel Santilone et al. Differential morphofunctional characteristics and gene expression in fast and slow muscle of rats with monocrotaline-induced heart failure. **Journal of Molecular Histology**, v. 42, p. 205-215, 2011.

BODINE, Sue C. et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1704-1708, 2001.

BORDA, Ricardo Meirelles. Efeito de diferentes intensidades de exercício físico aeróbico sobre parâmetros cardiovasculares na hipertensão pulmonar. 2015. 52 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/122355> acesso em 28/11/2021

BRINK, Marijke et al. Angiotensin II causes weight loss and decreases circulating insulin-like growth factor I in rats through a pressor-independent mechanism. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 11, p. 2509-2516, 1996.

BUEGE, John A.; AUST, Steven D. Microsomal lipid peroxidation. In: **Methods in Enzymology**. Academic press, 1978. p. 302-310.

BURNISTON, Jatin G. et al. Myotoxic effects of clenbuterol in the rat heart and soleus muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, n. 5, p. 1824-1832, 2002.

BURNSTOCK, G. Local mechanisms of blood flow control by perivascular nerves and endothelium. **Journal of Hypertension. Supplement: Official Journal of The International Society of Hypertension**, v. 8, n. 7, p. S95-106, 1990.

CALORE, E.E et al. Morphometric evaluation of muscle fiber types in different skeletal muscles of rats. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 34, n. 4, p. 403-407, 2002.

CHEN-SCARABELLI, Carol et al. A critical review of the use of carvedilol in ischemic heart disease. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, v. 12, p. 391-401, 2012.

CLARK, Andrew L. et al. Effect of beta-adrenergic blockade with carvedilol on cachexia in severe chronic heart failure: results from the COPERNICUS trial. **Journal of cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 8, n. 4, p. 549-556, 2017.

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

CORSSAC, Giana Blume et al. Pulmonary arterial hypertension induces the release of circulating extracellular vesicles with oxidative content and alters redox and mitochondrial homeostasis in the brains of rats. **Hypertension Research**, v. 44, n. 8, p. 918-931, 2021.

DRAKE, Jennifer I. et al. Chronic carvedilol treatment partially reverses the right ventricular failure transcriptional profile in experimental pulmonary hypertension. **Physiological Genomics**, v. 45, n. 12, p. 449-461, 2013.

DE MELO ROCHA, Raissa Linares et al. Parâmetros morfométricos e quantitativos de tecidos adiposos de ratos alimentados com resíduos de lichia. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2020.

EBNER, Nicole et al. Molecular mechanisms and treatment targets of muscle wasting and cachexia in heart failure: an overview. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v. 8, n. 1, p. 15-24, 2014.

EVANS, William J. et al. Cachexia: a new definition. **Clinical Nutrition**, v. 27, n. 6, p. 793-799, 2008.

FARHAT, Rawad et al. Carvedilol prevents counterregulatory failure and impaired hypoglycaemia awareness in non-diabetic recurrently hypoglycaemic rats. **Diabetologia**, v. 62, p. 676-686, 2019.

FROHLICH, Edward D. et al. The heart in hypertension. **New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 14, p. 998-1008, 1992.

GAROFALO, Maria AR et al. Effect of acute cold exposure on norepinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 60, n. 3, p. 206-208, 1996.

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

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

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

HARRIS, Kelly F.; MATTHEWS, Karen A. Interactions between autonomic nervous system activity and endothelial function: a model for the development of cardiovascular disease. **Psychosomatic Medicine**, v. 66, n. 2, p. 153-164, 2004.

HERNDON, David N. et al. Reversal of catabolism by beta-blockade after severe burns. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 17, p. 1223-1229, 2001.

HILAL-DANDAN, Randa; BRUNTON, Laurence. Manual de farmacologia e terapêutica de Goodman & Gilman. Grupo A, 2015. E-book. ISBN 9788580555066. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788580555066/>. Acesso em: 14 mai. 2023.

HOEPER, Marius M. et al. Pulmonary hypertension due to chronic lung disease: updated recommendations of the Cologne Consensus Conference 2011. **International Journal of Cardiology**, v. 154, p. S45-S53, 2011.

HOEPER, Marius M. et al. A global view of pulmonary hypertension. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 4, n. 4, p. 306-322, 2016.

HRYNIEWICZ, Katarzyna et al. Partial reversal of cachexia by β -adrenergic receptor blocker therapy in patients with chronic heart failure. **Journal of Cardiac Failure**, v. 9, n. 6, p. 464-468, 2003.

HUMBERT, Marc et al. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: Developed by the task force for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS). Endorsed by the International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) and the European Reference Network on rare respiratory diseases (ERN-LUNG). **European Heart Journal**, v. 43, n. 38, p. 3618-3731, 2022.

HYLTANDER, A. et al. β -Adrenoceptor activity and resting energy metabolism in weight losing cancer patients. **European Journal of Cancer**, v. 36, n. 3, p. 330-334, 2000.

IRIGOYEN, M. C. et al. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Revista Brasileira de Hipertensão**, 2001; 8(1):55-62.

KAY JM, Harris P, Heath D. Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. **Thorax** 22: 176 –179, 1967.

KIELY, David G. et al. Pulmonary hypertension: diagnosis and management. **BMJ Public Health**, v. 346, 2013.

LAU, Edmund MT et al. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. **Nature Reviews Cardiology**, v. 14, n. 10, p. 603-614, 2017.

LEE, David E. et al. Cancer-induced cardiac atrophy adversely affects myocardial redox state and mitochondrial oxidative characteristics. **Journal of Clinical Sleep Medicine: Rapid Communications**, v. 4, n. 1, p. 3-15, 2021.

LEBEL, Carl P et al., 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, 1992.

LEBER, Laurence et al. Epidemiology of pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: identification of the most accurate estimates from a systematic literature review. **Pulmonary Circulation**, v. 11, n. 1, p. 2045894020977300, 2021.

LIMA-SEOLIN, Bruna Gazzi et al. Bucindolol improves right ventricle function in rats with pulmonary arterial hypertension through the reversal of autonomic imbalance. **European Journal of Pharmacology**, v. 798, p. 57-65, 2017.

LOHSE, Martin J et al.. What is the role of β -adrenergic signaling in heart failure?. **Circulation Research**, v. 93, n. 10, p. 896-906, 2003.

LLESUY, Susana F et al. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. **Tumori Journal**, v. 71, n. 3, p. 241-249, 1985.

LLOVERA, Marta et al.. Effects of tumor necrosis factor- α on muscle-protein turnover in female Wistar rats. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 16, p. 1334-1339, 1993.

MARTINEZ, Sabrina T et al., A Determinação estrutural do alcalóide pirrolizidínico monocrotalina: Exemplo dos desafios da química de produtos naturais até os anos sessenta do Século XX. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 2, p. 300-311, 2013.

MEYRICK B, Gamble W and Reid L. Development of crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. **American Journal of Physiology** 239:H692-702, 1980.

MOCUMBI, Ana Olga et al. A global perspective on the epidemiology of pulmonary hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 31, n. 4, p. 375-381, 2015.

MOLINARI, Francesca et al. Animal models of cardiac cachexia. **International Journal of Cardiology**, v. 219, p. 105-110, 2016.

OKOSHI, Marina Politi et al. Cardiac cachexia: perspectives for prevention and treatment. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 108, p. 74-80, 2016.

OKUMURA, Kenichi et al. Carvedilol improves biventricular fibrosis and function in experimental pulmonary hypertension. **Journal of Molecular Medicine**, v. 93, p. 663-674, 2015.

OLIVEIRA-JUNIOR, Silvio A. et al. Efeito cardioprotetor do exercício resistido no remodelamento ventricular esquerdo associado à hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 119, p. 585-586, 2022.

ORTIZ, Vanessa Duarte et al. Carvedilol and thyroid hormones co-administration mitigates oxidative stress and improves cardiac function after acute myocardial infarction. **European Journal of Pharmacology**, v. 854, p. 159-166, 2019.

O'SUILLEABHAIN, et al.. Autonomic dysfunction in the Lambert-Eaton myasthenic syndrome: serologic and clinical correlates. **Neurology**, v. 50, n. 1, p. 88-93, 1998.

PALMER, Robert M et al. The effect of insulin and intermittent mechanical stretching on rates of protein synthesis and degradation in isolated rabbit muscle. **Biochemical Journal**, v. 230, n. 1, p. 117-123, 1985.

PAN LC, et al. COR pulmonale is caused by monocrotaline and dehydro monocrotaline, but not by glutathione or cysteine conjugates of dihydropyrrrolizine. **Toxicol Applied Pharmacology** 118:87-97, 1993.

PAULIN, Roxane; MICHELAKIS, Evangelos D. The metabolic theory of pulmonary arterial hypertension. **Circulation Research**, v. 115, n. 1, p. 148-164, 2014.

PEIXOTO DA SILVA, Sara et al. Cancer cachexia and its pathophysiology: links with sarcopenia, anorexia and asthenia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 11, n. 3, p. 619-635, 2020.

PICHARDO, Julieta et al. Myocardial oxidative stress changes during compensated right heart failure in rats. **Stress Adaptation, Prophylaxis and Treatment**, p. 51-57, 1999.

PIETZSCH, Stefan et al. Modulation of cardiac AKT and STAT3 signalling in preclinical cancer models and their impact on the heart. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1867, n. 3, p. 118519, 2020.

POLONIO, Igor Bastos et al. Comparison of two experimental models of pulmonary hypertension. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38, p. 452-460, 2012.

POOL, Andrew C. et al. The impact of physician weight discussion on weight loss in US adults. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 8, n. 2, p. e131-e139, 2014.

PORPORATO, P. E. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. **Oncogenesis**, v. 5, n. 2, p. e200-e200, 2016.

POWERS, Scott K. et al. Oxidative stress and disuse muscle atrophy: cause or consequence?. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 15, n. 3, p. 240, 2012.

PUGLIESE, S. C. et al. The role of inflammation in hypoxic pulmonary hypertension: from cellular mechanism to clinical phenotypes. **American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology**, 2014; 308(3):229-25

RAHMAN, Adam et al. Malnutrition and cachexia in heart failure. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 40, n. 4, p. 475-486, 2016.

REEDS, P. J. et al. The effect of β -agonists and antagonists on muscle growth and body composition of young rats (*Rattus sp.*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v. 89, n. 2, p. 337-341, 1988.

RIGATTO, Katya et al. Diminazene aceturate improves autonomic modulation in pulmonary hypertension. **European Journal of Pharmacology**, v. 713, n. 1-3, p. 89-93, 2013.

RODRIGUES, Anna CZ et al. The sympathetic nervous system regulates skeletal muscle motor innervation and acetylcholine receptor stability. **Acta Physiologica**, v. 225, n. 3, p. e13195, 2019.

ROSSIGNOL, Patrick et al. Loss in body weight is an independent prognostic factor for mortality in chronic heart failure: insights from the GISSI-HF and Val-HeFT trials. **European Journal of Heart Failure**, v. 17, n. 4, p. 424-433, 2015.

RUFFOLO, Robert R.; FEUERSTEIN, Giora Z. Pharmacology of carvedilol: rationale for use in hypertension, coronary artery disease, and congestive heart failure. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 11, p. 247-256, 1997.

SADEGHI, Mohammadamin et al. Cancer cachexia: Diagnosis, assessment, and treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 127, p. 91-104, 2018.

SIES, Helmut. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology: Translation and Integration**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.

SOUZA-RABBO, Maristela P. et al. Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, n. 8, p. 944-948, 2008.

STEFANON, Ivanita et al. Left and right ventricle late remodeling following myocardial infarction in rats. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64986, 2013.

SYSOL, J. R.; MACHADO, R. F. Classification and pathophysiology of pulmonary hypertension. **Continuing Cardiology Education**, v. 4, n. 1, p. 2-12, 2018.

SZTUKA, Katarzyna; JASIŃSKA-STROSCHEIN, Magdalena. Animal models of pulmonary arterial hypertension: a systematic review and meta-analysis of data from 6126 animals. **Pharmacological Research**, v. 125, p. 201-214, 2017.

TABOROWSKA, Malwina et al. Morphometric properties and innervation of muscle compartments in rat medial gastrocnemius. **Somatosensory & Motor Research**, v. 33, n. 3-4, p. 200-208, 2016.

TAN, Lip-Bun et al. Characterization of adrenoceptor involvement in skeletal and cardiac myotoxicity induced by sympathomimetic agents: toward a new bioassay for β -blockers. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 41, n. 4, p. 518-525, 2003.

TAN, Carlyn R. et al. Pancreatic cancer cachexia: a review of mechanisms and therapeutics. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 88, 2014.

TAKAISHI, Kazumi et al. Human vascular smooth muscle function and oxidative stress induced by NADPH oxidase with the clinical implications. **Cells**, v. 10, n. 8, p. 1947, 2021.

TANAI, Edit; FRANTZ, Stefan. Pathophysiology of heart failure. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 1, p. 187-214, 2011.

THANDAVARAYAN, Rajarajan A. et al. Pathophysiology of acute and chronic right heart failure. **Cardiology Clinics**, v. 38, n. 2, p. 149-160, 2020.

THOMAS, James A.; MALLIS, Robert J. Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls. **Experimental Gerontology**, v. 36, n. 9, p. 1519-1526, 2001.

TOKARNIA, C. H et al. Plantas experimentalmente tóxicas para bovinos, porém incerto se de interesse pecuário. **Plantas Tóxicas do Brasil**, p. 240-242, 2000.

TRIPOSKIADIS et al. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. **Journal of the American College of Cardiology**; 54:1747–1762, 2009.

TUDER, Rubin M. et al. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. **The American Journal of Pathology**, v. 144, n. 2, p. 275, 1994.

TÜRCK, Patrick et al. Trepidil improves hemodynamic, echocardiographic and redox state parameters of right ventricle in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 182-190, 2018.

TÜRCK, Patrick et al. Blueberry extract decreases oxidative stress and improves functional parameters in lungs from rats with pulmonary arterial hypertension. **Nutrition**, v. 70, p. 110579, 2020.

VAN CAUWENBERGH, Deborah et al. Malfunctioning of the autonomic nervous system in patients with chronic fatigue syndrome: a systematic literature review. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 44, n. 5, p. 516-526, 2014.

VESCOVO, Giorgio et al. Skeletal muscle myosin heavy chain expression in rats with monocrotaline-induced cardiac hypertrophy and failure. Relation to blood flow and degree of muscle atrophy. **Cardiovascular Research**, v. 39, n. 1, p. 233-241, 1998.

VUDATHA, Vignesh et al. Review of mechanisms and treatment of cancer-induced cardiac cachexia. **Cells**, v. 11, n. 6, p. 1040, 2022.

WEST, James et al. A potential role for insulin resistance in experimental pulmonary hypertension. **European Respiratory Journal**, v. 41, n. 4, p. 861-871, 2013.

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.

WOLSK, Emil et al. The influence of age on hemodynamic parameters during rest and exercise in healthy individuals. **Journal of the American College of Cardiology: Heart Failure**, v. 5, n. 5, p. 337-346, 2017.

ZHANG, Han et al. Oxidative stress: roles in skeletal muscle atrophy. **Biochemical Pharmacology**, p. 115664, 2023.

ZIMMER, Alexandra. Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre o metabolismo do óxido nítrico e da endotelina-1 e sobre o estresse oxidativo no parênquima pulmonar de ratos com hipertensão arterial pulmonar. 2016. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/157938>, acesso em: 28/11/2021.

ZIMMER, A 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, p. 173699, 2021.

ZIMMER, A. 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, p. 93-109, 2020.



U F R G S

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 41774

Título: EFEITOS DO BETA-BLOQUEADOR CARVEDILOL NA ATROFIA MUSCULAR ESQUELETICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE CAQUEXIA CARDIACA INDUZIDA POR MONOCROTALINA

Vigência: 20/06/2022 à 20/06/2024

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ADRIANE BELLO KLEIN - coordenador desde 20/06/2022

Rodrigo Hernandes Paludo - desde 20/06/2022

TANIA REGINA GATTELLI FERNANDES PIEDRAS - Técnico de Laboratório desde 20/06/2022

Equipe Externa:

Paulo Cavalheiro Schenkel - pesquisador desde 20/06/2022

A Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião virtual realizada em 09/05/2022 - Plataforma MConf UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 84 ratos Wistar (Rattus norvegicus), machos, com 180 gramas e aproximadamente 30 dias de idade, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL-UFRGS), de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Terça-Feira, 17 de Maio de 2022

MAITE DE MORAES VIEIRA
Coordenador da comissão de ética

SAPIENS UNILASALLE 2022

A UTOPIA DO SÉCULO XXI: A EDUCAÇÃO E A CIÊNCIA EM PROL DA PAZ E DA SUSTENTABILIDADE

**EFEITOS DO BETA-BLOQUEADOR CARVEDILOL NA ATROFIA MUSCULAR
ESQUELÉTICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE CAQUEXIA CARDÍACA
INDUZIDA POR MONOCROTALINA**

Rodrigo Hernandes Paludo

Adriane Belló Klein

Cristina Campos Carraro



**VIII Simpósio Internacional de Estresse Oxidativo
e Doenças Cardiovasculares**



Certificado

Certificamos que **Rodrigo Hernandes Paludo** participou do VIII Simpósio Internacional de Estresse Oxidativo e Doenças Cardiovasculares, organizado pelo Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. Duração total: 08 horas.

Porto Alegre, 27 de Julho de 2023.

Cristina Campos Carraro

Dra Cristina Campos Carraro
Coordenadora do VIII Simpósio Internacional de
Estresse Oxidativo e Doenças Cardiovasculares

Nadja Schroder

Dra Nadja Schroder
Coordenadora do Programa de Pós
Graduação Fisiologia - UFRGS