

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Instituto de Ciências Básicas da Saúde**

**Departamento de Fisiologia**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia**

**ADAPTAÇÃO OXIDATIVA E FUNCIONAL PROGRESSIVA DO SISTEMA  
CARDIOPULMONAR SECUNDÁRIA À HIPERTENSÃO ARTERIAL  
PULMONAR EM RATOS**

**Tese de doutorado**

**FABIANO LEICHSENDRING SILVA**

Porto Alegre, 2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Instituto de Ciências Básicas da Saúde**

**Departamento de Fisiologia**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia**

**ADAPTAÇÃO OXIDATIVA E FUNCIONAL PROGRESSIVA DO SISTEMA  
CARDIOPULMONAR SECUNDÁRIA À HIPERTENSÃO ARTERIAL  
PULMONAR EM RATOS**

Tese de doutorado apresentada à  
UFRGS como requisito parcial  
obrigatório para obtenção do título  
de doutor em Ciências Biológicas:  
Fisiologia.

FABIANO LEICHSENDRING SILVA

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ADRIANE BELLÓ KLEIN

COORIENTADORA: PROFA. DRA. SUSANA LLESUY

Porto Alegre, 2011

A maior necessidade do mundo é a de homens - homens que não se compram nem se vendam; homens que no íntimo da alma sejam verdadeiros e honestos; homens que não temam chamar o erro pelo seu nome; homens, cuja consciência seja tão fiel ao dever como a bússola o é ao pólo; homens que permaneçam firmes pelo que é reto, ainda que aconteça tudo errado.

Ellen G. White

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por tudo e por todos. O Criador e mantenedor de toda ciência que me oportunizou descobrir.

A minha amada esposa, Cáren, e aos meus filhos. É maravilhoso poder cada dia acordar e saber que vocês estão comigo. Obrigado por tolerar a ausência e pelo apoio incondicional, esse foi meu combustível para continuar.

Aos meus pais, Daniel e Lori. Pelas noites em claro comigo e por mim, pelo apoio, cuidado e inigualável dedicação, vocês são minha maior escola.

As professoras Adriane Belló Klein e Susana Llesuy pela incansável disposição, tolerância e exemplar dedicação à pesquisa e arte do ensinar.

A Tânia Regina Gatelli Fernandes, pelo apoio técnico e amizade nesses longos anos de trabalho.

Aos todos colegas de laboratório da UFRGS e da FADBA. Faria injustiça se citasse nomes, pois foram partes integrantes de todos momentos desse trabalho. Vocês são uma equipe maravilhosa.

E aos centros de formação que me oportunizaram essa realização. A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, minha base acadêmica. A Universidade Federal do Rio de Janeiro, particularmente ao professor Samuel dos Santos Valença pelo suporte e abertura. A Faculdade Adventista da Bahia pelo apoio a realização desse trabalho.

## RESUMO

A Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP) é uma doença que acomete os vasos pulmonares, essencialmente pré-capilares, levando ao remodelamento da parede vascular. Caracteriza-se como síndrome hemodinâmica, que consiste no aumento da resistência vascular pulmonar e da pós-carga ventricular direita. Um grande número de evidências apresenta a participação do estresse oxidativo no desenvolvimento das mudanças cardiopulmonares decorrentes da HAP. Assim, a proposta desse estudo foi avaliar alterações estruturais e de estresse oxidativo tempo-dependentes produzidas pela monocrotalina, droga que mimetiza a HAP em humanos, sobre o pulmão de ratos e sua repercussão tardia na função cardíaca ventricular esquerda.

Utilizamos ratos Wistar com 2 meses de idade, sendo que os procedimentos experimentais foram divididos em 2 momentos distintos: a primeira etapa direcionada a análise pulmonar e a segunda para análise cardíaca. A indução de HAP foi feita por injeção de monocrotalina (MCT) 60 mg/kg. No primeiro momento, investigamos as alterações morfométricas e oxidativas pulmonares aos 7 e 21 dias após MCT, sendo que os pulmões foram homogeneizados para análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, carbonilação das proteínas, ânion radical superóxido por meio da reação de *NitroBlue Tetrazolium*, atividades da mieloperoxidase (MPO) e da catalase (CAT). Após, investigamos as alterações do ventrículo esquerdo (VE) aos 7, 21 e 31 dias, sendo avaliadas a função do VE por meio de ecocardiografia e marcadores oxidativos no homogeneizado de VE pela razão das glutationas (GSSG/GSH), tioredoxina redutase (TrxR), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e concentração de vitamina C.

Observamos hipertrofia do VD e congestão pulmonar nos grupos MCT 21 e 31 dias. A estereologia do pulmão apresentou redução nas densidades de volume e área, associada ao aumento do espaço alveolar aos 21 dias após MCT, bem como aumento da lipoperoxidação no homogeneizado de pulmão, maior concentração de radical superóxido e maior atividade da CAT e MPO. A ecocardiografia apresentou modificação na onda de fluxo da artéria pulmonar, característica de aumento de resistência, a partir de 21 dias após MCT, bem como aumento do tempo de ejeção e nos parâmetros de função ventricular esquerda aos 31 dias após MCT. A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no homogeneizado de VE esteve aumentada nos grupos MCT 21 e 31 dias e na análise dos antioxidantes observamos redução na concentração de ácido ascórbico e aumento de TrxR no VE.

Foi demonstrado aumento da resistência vascular pulmonar, bem como aumento de pró-oxidantes e do dano oxidativo a lipídios no homogeneizado de pulmão após 21 dias de indução de HAP por MCT; esse dano é acompanhado por aumento na atividade da CAT e histologia sugestiva de congestão pulmonar nesse tecido, seguida por alteração ventricular direita. Estas mudanças no ventrículo direito promovidas pela HAP podem contribuir, a longo prazo, para a disfunção ventricular esquerda observada aos 31 dias após MCT. Essas alterações do VE estão associadas ao aumento de peróxido de hidrogênio e redução de vitamina C no homogeneizado ventricular esquerdo.

## ABSTRACT

Pulmonary Arterial Hypertension (PAH) is a disease that affects the pulmonary vessels, essentially pre-capillaries, leading to remodeling of the vascular wall. It is characterized hemodynamic syndrome, which is the increase in pulmonary vascular resistance and right ventricular afterload. A growing body of evidence shows the involvement of oxidative stress in the development of the cardiopulmonary changes due to PAH. Thus, the purpose of this study was to evaluate structural changes and time-dependent oxidative stress produced by monocrotaline, a drug that mimics the human PAH, on the rat lung and its impact on late left ventricular cardiac function.

Wistar rats with 2 months of age were used in this research. The experimental procedures were divided into two distinct periods: the first step aimed at analyzing lung and the second for cardiac analysis. Induction of PAH was performed by injection of monocrotaline (MCT) 60 mg/kg. At first we investigated morphological changes and oxidative lung at 7 and 21 days after MCT, and the lungs were homogenized for analysis of thiobarbituric acid reactive substances, protein carbonylation, superoxide anion radical by the reaction of nitroblue tetrazolium, activities myeloperoxidase (MPO) and catalase (CAT). After, we analyzed changes in left ventricular (LV) at 7, 21 and 31 days and evaluated LV function by echocardiography and oxidative markers in the LV homogenate by the ratio of glutathione (GSSG / GSH), thioredoxin reductase (TrxR), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and concentration of vitamin C.

Was Observed cardiac hypertrophy, pulmonary congestion and RV in MCT groups 21 and 31 days. The stereology showed a reduction in lung volume and area densities, associated with an increased alveolar space on day 21 after MCT, as well as increased lipid peroxidation in lung homogenate, increased concentration of superoxide anion and increased activity of CAT and MPO. Echocardiography showed wave of change in pulmonary artery flow from 21 days after MCT, and increase in ejection time and the parameters of left ventricular function at 31 days after MCT. The concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in homogenized LV was increased in MCT groups 21 and 31 days and the analysis of antioxidants observed reduction in the concentration of ascorbic acid and increased TrxR in the LV.

Our findings showed increased pulmonary vascular resistance, as well as increased pro-oxidants and oxidative damage to lipids in lung homogenate after 21 days of induction of PAH by MCT, this damage is accompanied by increased activity of CAT and histological pulmonary congestion in this tissue, followed by right ventricular changes. These changes in the right ventricle promoted by the PAH can contribute in the long run, to left ventricular dysfunction observed at 31 days after MCT. These changes are associated with increased LV for hydrogen peroxide and vitamin C reductions in the left ventricular homogenate.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1.</b> Relação da hemodinâmica (DC: débito cardíaco, PAP: pressão arterial média na artéria pulmonar; RVP: resistência vascular pulmonar) e clínica (CF: Classe funcional da NYHA) na evolução da hipertensão arterial pulmonar não tratada.....	12
<b>FIGURA 2.</b> Alteração da estrutura química da monocrotalina em sua metabolização hepática.....	14
<b>FIGURA 3.</b> Esquema de progressão patológica dose-dependente da monocrotalina.....	16
<b>FIGURA 4.</b> Cortes transversais de corações submetidos a modelo experimental de hipertensão arterial pulmonar por MCT. VD: Ventrículo direito, VE: Ventrículo esquerdo.....	16
<b>FIGURA 5.</b> Efeito da lipoperoxidação sobre a membrana plasmática.....	18
<b>FIGURA 6.</b> Representação esquemática da formação de ERO e da ação antioxidante enzimática.....	20
<b>FIGURA 7.</b> Representação esquemática das reações no sistema da glutathiona e tioredoxina.....	21

## LISTA DE ABREVIATURAS

AOX – Antioxidante

AT/ET – Razão do tempo de aceleração pelo tempo de ejeção de sangue na artéria pulmonar

CAT – Catalase

DNA – Ácido desoxirribonucléico

E/A – Razão da velocidade máxima de enchimento do VE no início da diástole pela velocidade máxima de enchimento do VE durante a contração atrial

ERK – Proteína cinase regulada por sinal extracelular

ERO – Espécies reativas de oxigênio

FAC – Mudança de área fracional

FGF – Fator de crescimento dos fibroblastos

GSHPx – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione oxidada

GRX – Glutaredoxina

HAP – Hipertensão arterial pulmonar

IGF-IR – Fator de crescimento semelhante à insulina-1

JNK – c-jun-NH<sub>2</sub>-terminal

MAPK – Proteína cinase ativada mitógeno

MCT – Monocrotalina

SOD – Superóxido dismutase

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P

NBT - *nitroblue tetrazolium*

NFκB – Fator nuclear κB

NO – Óxido nítrico



PMI – Índice de performance do miocárdio

RL – Radicais livres

SOD – Superóxido dismutase

TGF- $\beta$  – Fator de crescimento tumoral tipo beta

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

TRX – Tioredoxina

TrxR – Tioredoxina redutase

VD – Ventrículo direito

VE – Ventrículo esquerdo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>1.1 Hipertensão Arterial Pulmonar e Compensação Cardíaca</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2 Modelo de HAP por monocrotalina</b> .....	<b>14</b>
<b>1.3 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), Sistemas de Defesa Antioxidante e Estresse Oxidativo</b> .....	<b>17</b>
<b>1.4 Relação entre HAP por MCT e estresse oxidativo</b> .....	<b>22</b>
<b>2 HIPÓTESE</b> .....	<b>25</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>26</b>
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1 Animais</b> .....	<b>27</b>
4.1.1 Dimensionamento Amostral .....	27
4.1.2 Aspectos éticos da pesquisa.....	27
<b>4.2 Descarte dos resíduos biológicos e biossegurança</b> .....	<b>28</b>
<b>4.3 Indução da hipertensão pulmonar</b> .....	<b>28</b>
<b>4.4 Cálculo do índice de hipertrofia cardíaca</b> .....	<b>28</b>
<b>4.5 Ecocardiograma</b> .....	<b>29</b>
<b>4.6 ETAPA 1 – Procedimento experimental para análise dos pulmões</b> .....	<b>30</b>
4.6.1 Grupos experimentais .....	30
4.6.2 Seqüência experimental.....	30
4.6.3 Preparação histológica do pulmão.....	31
4.6.4 Estereologia de pulmão.....	31
4.6.5 Análises bioquímicas nos pulmões .....	32
a) <i>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i> .....	32
b) <i>Técnica de oxidação de proteínas (Carbonilas)</i> .....	32
c) <i>Mieloperoxidase (MPO)</i> .....	33
d) <i>Determinacion de ânion superóxido pela reação com Nitroblue Tetrazolium (NBT)</i> .....	33

<i>e) Atividade da catalase</i> .....	34
<i>f) Quantificação de Proteínas</i> .....	34
<b>4.7 ETAPA 2 – Procedimento experimental para análise dos corações ....</b>	<b>35</b>
4.7.1 Grupos experimentais .....	35
4.7.2 Seqüência experimental .....	35
4.7.3 Análises Bioquímicas no Coração .....	35
<i>a) Determinação da concentração da glutathiona total (GSH) e reduzida (GSSG)</i> .....	35
<i>b) Atividade da tioredoxina redutase (TrxR)</i> .....	36
<i>c) Medida de peróxido de hidrogênio</i> .....	36
<i>d) Concentração de ácido ascórbico (vitamina C)</i> .....	37
<i>e) Quantificação de proteínas</i> .....	37
<b>4.8 Análise estatística .....</b>	<b>37</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>5.1 Artigo I: Time course of histological changes associated with oxidative stress in lungs of pulmonary arterial hypertensive rats. ....</b>	<b>39</b>
<b>5.2 Artigo II: Association of the time course of pulmonary arterial hypertension with changes in oxidative stress in the left ventricle.....</b>	<b>60</b>
<b>6 DISCUSSÃO CONCLUSIVA .....</b>	<b>68</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>79</b>
<b>8 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Hipertensão Arterial Pulmonar e Compensação Cardíaca**

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) pode ser definida como o estado hemodinâmico causado por diversos processos patológicos que têm como resultado a elevação da pressão arterial pulmonar decorrente da vasoconstrição e remodelamento da parede vascular pulmonar. Considera-se um indivíduo com hipertensão arterial pulmonar quando a sua pressão arterial pulmonar sistólica for maior que 30 mmHg, ou a pressão arterial pulmonar média estiver acima de 20 mmHg, em repouso (ROSENZWIG et al., 2004). A elevação da pressão pulmonar promove aumento da pós-carga ventricular direita, podendo culminar em progressiva insuficiência cardíaca.

A HAP pode se desenvolver como consequência de várias situações clínicas como doenças do tecido conjuntivo, embolia pulmonar crônica, insuficiência ventricular esquerda, entre outras. A HAP é uma doença incapacitante que progride silenciosamente, dificultando assim a prevenção precoce, uma vez que seus sintomas são insidiosos, começando lentamente e com o tempo levam à debilidade na condição física. A síndrome é classificada em cinco grupos: a) idiopática; b) causada por envolvimento do coração esquerdo; c) decorrente de hipoxemia; d) relacionada à obstrução da artéria pulmonar e e) miscelânea que agrupa causas como a sarcoidose, adenopatia, tumor e fibrose mediastinal (SIMONNEAU et al., 2009).

Dados norte-americanos descrevem a HAP idiopática com incidência de 1 a 2 casos por milhão por ano e prevalência de 15 casos por milhão de habitantes, com predominância do sexo feminino, na razão aproximada de 2:1 e início dos sintomas predominantemente após a segunda ou terceira década

de vida (MCGOON et al., 2004). No Brasil, não existem estimativas diretas bem estabelecidas (LAPA et al., 2006).

Os sinais mais evidentes de HAP são dispnéia, fadiga, angina e cianose de extremidades, sendo que a expectativa de vida não ultrapassa três anos após o diagnóstico, quando não tratado adequadamente. O prognóstico dos pacientes pode ser determinado a partir de dados preditores de mortalidade, sendo avaliado a partir de marcadores estabelecidos pela classe funcional da *New York Heart Association*, dentre os quais se destacam a avaliação da capacidade de exercícios e as medidas ecocardiográficas (CAMARGO et al., 2009). A classe funcional (CF) como marcadora de gravidade determina que pacientes de classe I ou II têm sobrevida média de 58,6 meses, pacientes da classe III sobrevida de 31,5 meses e seis meses de sobrevida nos pacientes da classe IV. Dentre os achados ecocardiográficos, o aumento do átrio direito e a presença de derrame pericárdico são os principais indicadores prognósticos, pois denotam a resposta cardíaca ao aumento de resistência à circulação pulmonar (Figura 1).

Parâmetros hemodinâmicos

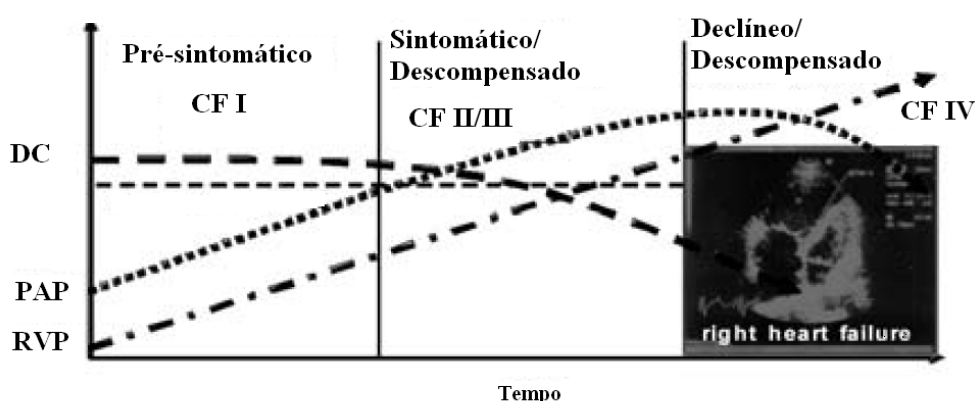


Figura 1. Relação da hemodinâmica (DC: débito cardíaco, PAP: pressão arterial média na artéria pulmonar; RVP: resistência vascular pulmonar) e clínica (CF: Classe funcional da NYHA) na evolução da hipertensão arterial pulmonar não tratada (DOMENIGHETTI, 2007).

Muitos fatores têm sido relacionados ao remodelamento vascular na HAP, entre eles estão a endotelina-1, o tromboxano, fator de crescimento derivado das plaquetas, fatores de crescimento epidermais, fator de crescimento beta de fibroblastos (TGF- $\beta$ ), serotonina, citocinas inflamatórias, hipóxia, aumento do estresse de cisalhamento e aumento na tensão de parede do vaso (HOSSEIN et al., 2006). Os efeitos a longo prazo da HAP estão associados ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca.

A hipertrofia é um dos principais mecanismos pelo qual o coração busca compensar sobrecargas de volume ou de pressão (COHN, 1995; MEIJS et al., 2007; LASKEY et al., 2007), sendo o maior preditor da progressão da doença cardíaca. A resposta da musculatura miocárdica a condições alteradas é causada tanto por estímulos fisiológicos quanto patológicos. A hipertrofia patológica ocorre em resposta à sinalização patofisiológica de estresse, pela ativação neurohumoral, estenose aórtica, inflamação ou doença cardíaca. Inicialmente, a hipertrofia é uma normalização do estresse de parede e preservação da contratilidade, mas pode avançar para uma descompensação e finalmente insuficiência cardíaca. Neste estágio final, observam-se prejuízos na vascularização do miocárdio, alterações na composição da matriz extracelular e fibrose (DEBOER et al., 2003).

A insuficiência cardíaca (IC) é definida como uma deficiência na capacidade do coração em bombear sangue em resposta às necessidades sistêmicas, resultando em fadiga prematura, dispnéia e/ou edema (HEINEKE; MOLKENTIN, 2006). A IC tem sido considerada a via comum do desfecho de diversas doenças, quer seja pelo aumento crônico da pressão arterial ou sobrecarga de volume (HILFIKER-KLEINER et al., 2006). Particularmente, a

resposta cardíaca à HAP tem sido relacionada ao *Cor pulmonale*, que é a modificação estrutural e funcional do ventrículo direito (hipertrofia e/ou dilatação) em resposta a alterações na resistência pulmonar podendo culminar em insuficiência cardíaca (WEITZENBLUM, 2003).

Estudos experimentais (PICHARDO et al., 1999; FARAHMAND et al., 2004; SOUZA-RABBO et al., 2008) têm sido capazes de reproduzir insuficiência ventricular direita a partir de um modelo de HAP.

## 1.2 Modelo de HAP por monocrotalina

A monocrotalina (MCT) é um alcalóide pirrolizidina encontrado em uma grande variedade de plantas, proveniente das espécies do gênero *Crotalaria*. Sua toxicidade é resultado da bioativação hepática, pelo citocromo P450 da família 3A, formando um alcalóide pirrólico dihidromonocrotalina (GLOWAZ et al., 1992; PAN et al., 1993) (Figura 2), que é capaz de atingir órgãos extra-hepáticos, incluindo o coração, os pulmões, os rins e o sistema nervoso central (YAN; HUXTABLE, 1996).

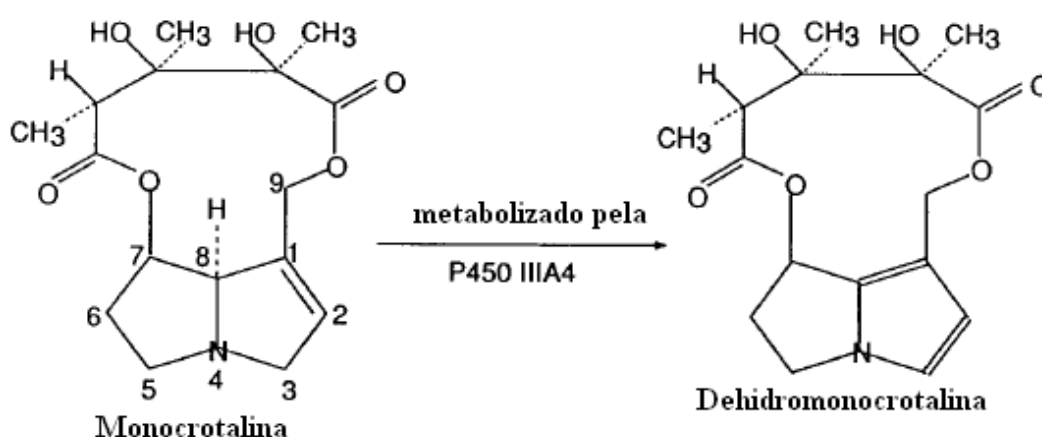


Figura 2. Alteração da estrutura química da monocrotalina em sua metabolização hepática (PEREIRA et al., 1998).

Nos pulmões, a monocrotalina causa edema, congestão pulmonar com áreas consolidadas no parênquima, além disso, pode causar alveolite fibrosante difusa, com espessamento de septos interalveolares, edema e infiltrado inflamatório mononuclear (NOBRE et al., 2004).

A MCT tem sido utilizada para reproduzir um modelo de HAP, de hipertrofia e insuficiência cardíaca direita, pois quando na circulação, causa proliferação celular nas arteríolas pulmonares (hiperplasia medial), impedância ao fluxo sanguíneo com conseqüente HAP. Este quadro progride à hipertrofia compensatória do ventrículo direito e progressivo desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Trabalhos envolvendo este modelo experimental têm apresentado alterações diferenciais tempo-dependentes. Farahmand et al. (2004) observou aumento na pressão ventricular direita a partir do sétimo dia após injeção de MCT, sendo que aos 14 dias encontrou aumento do peso do VD. Estudo feito por Daicho et al. (2009) acompanhou animais injetados com MCT por 8 semanas onde se verificou aumento do peso pulmonar, redução do peso corporal e hipertrofia cardíaca a partir de 14 dias, com sinais de insuficiência cardíaca direita (pressão venosa central, pressão ventricular sistólica e diastólica final aumentadas) a partir da sexta semana. A variabilidade de estudos com os efeitos da monocrotalina deve-se não somente às diferentes janelas temporais, mas também às concentrações da droga, caracterizando-se como uma droga de efeitos tempo e dose-dependentes (Figura 3).



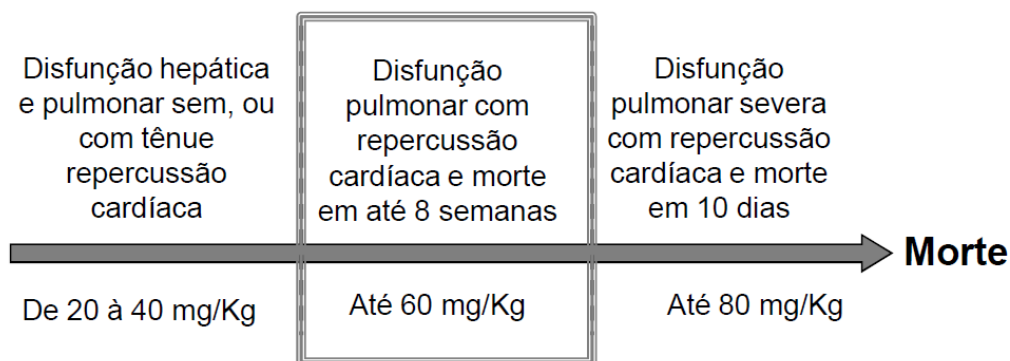


Figura 3. Esquema de progressão patológica dose-dependente da monocrotalina (DAICHO et al., 2009).

A administração de MCT na dose de 60 mg/kg promove, após 4 horas, alterações celulares como edema da camada média nas arteríolas pulmonares e migração de células inflamatórias depois de 8 a 16 horas, progredindo para remodelamento vascular até o oitavo dia (ROSEMBERG; RABINOVITCH, 1988; WILSON; SEGALL, 1989). Após sete dias, surgem os primeiros indícios de aumento da resistência vascular pulmonar pelo retardo no tempo de ejeção de sangue pela artéria pulmonar, iniciando mais íntima relação com a adaptação cardíaca, que irá culminar com insuficiência cardíaca por volta da terceira semana (JONES et al., 2002), e progressivo aumento do VD (Figura 4).

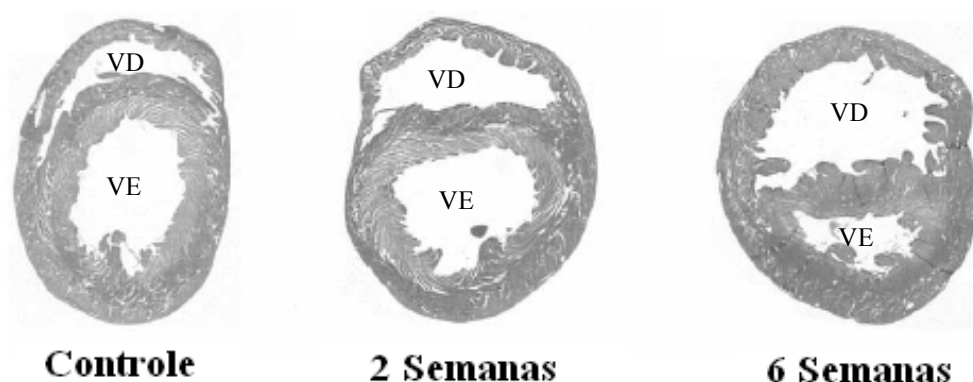


Figura 4. Cortes transversais de corações submetidos ao modelo experimental de hipertensão arterial pulmonar por MCT. VD: Ventrículo direito, VE: Ventrículo esquerdo. Adaptado de Farahmand et al. (2003).

Há considerável vantagem na utilização da MCT para indução de HAP, pois este modelo reproduz parâmetros funcionais e bioquímicos similares aos de humanos, tais como aumento nos níveis do peptídeo natriurético atrial, aumento nas concentrações de endotelina e hiperatividade do sistema renina-angiotensina, alteração no estado redox e aumento na produção de ERO (SOUZA-RABBO et al., 2008).

### **1.3 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), Sistemas de Defesa Antioxidante e Estresse Oxidativo**

A redução completa da molécula de oxigênio à água requer quatro elétrons (redução tetraeletrônica) e ocorre predominantemente na cadeia respiratória mitocondrial. É preciso ressaltar que esta reação nem sempre ocorre de maneira direta. Cerca de 5% do oxigênio, se reduz à água de maneira monoelétrica, dando origem a espécies reativas de oxigênio (ERO) como o oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ), ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH\cdot$ ).

Em concentrações fisiológicas, estas espécies atuam como segundos mensageiros de funções celulares vitais. Por outro lado, em condições patológicas há um grande aumento na formação de ERO. Nesta situação, verificam-se danos celulares importantes como, por exemplo, oxidação dos lipídios e proteínas da membrana plasmática, inativação de enzimas e oxidação do DNA (GIORDANO, 2005).

Algumas ERO são radicais livres. Denomina-se radical livre (RL) qualquer espécie química (átomo ou molécula) capaz de existência independente, que possua um ou mais elétrons desemparelhados em qualquer



de DNA, pode levar a alterações funcionais e a perda progressiva das propriedades metabólicas e enzimáticas celulares. A formação de carbonilas representa um marcador precoce da oxidação de proteínas. Elas envolvem cátions do ciclo redox como ferro e cobre, os quais têm ligação local em proteínas e podem transformar resíduos de aminoácidos em carbonilas na presença de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, sendo essa uma forma direta de medida de dano celular (STADTMAN; LEVINE, 2000).

Para que não predominem os efeitos deletérios desencadeados pelas altas concentrações de ERO, existem sistemas de defesa antioxidante, enzimáticos e não enzimáticos, que estabilizam essas espécies. Em condições fisiológicas, as concentrações de ERO são controladas predominantemente pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSHPx). A SOD age dismutando o  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$ , enquanto que a CAT e a GSHPx atuam na redução do  $H_2O_2$ . A CAT é uma hemoproteína que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio à  $H_2O$  e  $O_2$ , e a atividade enzimática é dependente de ferro em sua estrutura (SINGH et al., 2010).

A GSHPx converte peróxido de hidrogênio em água, oxidando a glutathiona reduzida (GSH) ao seu correspondente dissulfeto (GSSG) (MIEYAL et al., 2008). No entanto, situações de estímulo a produção de ERO, como hipóxia ou inflamação, elevam a produção de  $H_2O_2$  acima da capacidade antioxidante enzimática, conseqüentemente aumentando a concentração intracelular de  $H_2O_2$ . Essa situação propicia, na presença de ferro, a reação de Fenton e/ou Haber-Weiss originando radical hidroxil (Figura 6), um RL altamente reativo que potencialmente desencadeará desestruturação de outra

molécula iniciando a reação em cadeia que culminará com dano lipídico (mensurado pela LPO) ou protéico (mensurado pela carbonilação).

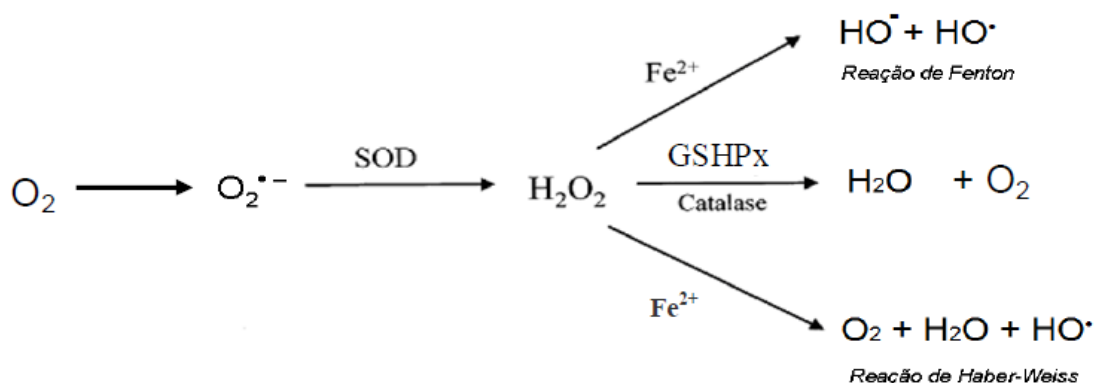


Figura 6. Representação esquemática da formação de ERO e da ação antioxidante enzimática (GRIEVE et al., 2004).

O radical hidroxil reage rapidamente com macromoléculas, motivo pelo qual ativa sistemas de defesa antioxidantes não enzimáticos como o da glutathiona e tioredoxina (AHSAN et al., 2009). A glutathiona (GSH) tem alto poder redutor devido sua capacidade de doar prótons combinada a sua alta concentração intracelular (BALLATORI et al., 2009; AQUILANO et al., 2011). Esta molécula pode oxidar-se enzimática ou não enzimaticamente, gerando glutathiona oxidada (GSSG). A regeneração da GSH se realiza pela atividade da glutathiona redutase (Figura 7). A relação entre a GSH e a GSSG tem sido bastante utilizada como parâmetro do estado redox celular (QIN et al., 2005; SINGH et al., 1995).

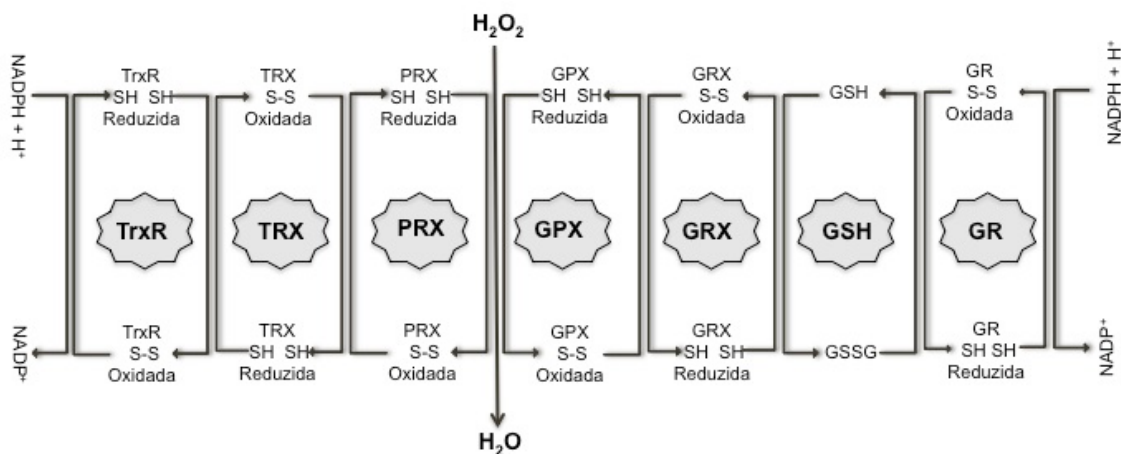


Figura 7. Representação esquemática das reações no sistema da glutatona e tioredoxina (adaptado de AHSAN et al., 2009). TrxR – Tiorredoxina Redutase; TRX – Tiorredoxina; PRX – Peroxiredoxina; GPX – Glutationa Peroxidase; GRX – Glutredoxina; GSH – Glutationa; GR – Glutationa Redutase.

Quando a glutatona se oxida, existe um sistema regenerador deste composto através da vitamina C e vitamina E. A vitamina C desempenha um importante papel antioxidante intracelular, agindo tanto como varredor de ERO (SERDAR et al., 2006), como doador de elétrons para manter as concentrações de NADPH necessárias para regeneração de GSH (KARAJIBANI et al., 2010) e de tioredoxina (Trx). Estudos experimentais têm demonstrado que a depleção da vitamina C leva ao dano oxidativo (NYSSÖNEN et al., 1997; KLIPSTEIN et al., 1999).

Assim como a glutatona, o sistema antioxidante da Trx tem merecido destaque por desempenhar importantes ações na modulação do estado redox celular. Esse sistema é formado pela tioredoxina, tioredoxina redutase e pelo cofator NADPH (WORLD et al., 2006). Nesta reação, a Trx torna-se oxidada e é regenerada para sua forma reduzida com auxílio da enzima Trx redutase (TrxR). Tanto a Trx encontrada predominantemente no citosol (Trx-1) quanto aquela encontrada na fração mitocondrial (Trx-2) têm mostrado forte

capacidade antioxidante por atuarem como varredores de ERO, em especial o  $H_2O_2$  (AGO; SADOSHIMA, 2006).

Vários estudos têm mostrado que o estado redox celular influencia diretamente as funções do sistema da Trx (MAULIK; DAS, 2008; YOSHIOKA et al., 2004; EBRAHIMIAN et al., 2008). Shioji et al. (2002) mostraram uma redução na formação de ERO associada ao aumento na expressão de Trx-1 quando foi administrada adriamicina, uma quinona antitumoral que tem sérios efeitos colaterais cardíacos, o que mais uma vez reforça a influência da Trx como moduladora do estado redox celular. Além destas propriedades antioxidantes que auxiliam no controle do estado redox celular, a Trx também influencia diferentes vias de sinalização intracelular por modular quinases e fatores de transcrição envolvidos tanto no crescimento, como na morte celular programada, através de interação proteína-proteína (AGO; SADOSHIMA, 2006; WORLD, 2006).

A incapacidade dos sistemas antioxidantes compensarem a produção de ERO culmina com desequilíbrio no estado redox intracelular e estresse oxidativo. O estresse oxidativo é classicamente definido como um aumento nas concentrações dos pró-oxidantes acima dos níveis fisiológicos e/ou diminuição das defesas antioxidantes (SIES, 1991).

#### **1.4 Relação entre HAP por MCT e estresse oxidativo**

O desenvolvimento da HAP pela MCT resulta em degeneração e/ou hiperplasia do endotélio pulmonar (DEMARCO et al., 2010), redução da luz e hipertrofia da túnica média das arteríolas pulmonares podem ser observados de 3 a 7 dias após injeção de MCT (MEYRICK; REID, 1979), resultando no aumento da resistência vascular pulmonar, aumentando assim a pressão no

VD. Observa-se também um decréscimo na razão do número de arteríolas pelo número de alvéolos 21 dias após a administração de MCT, indicando perda vascular (WILSON et al., 1992).

LUDKE et al. (2010) demonstraram redução da expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) após 21 dias da injeção de MCT. Posteriormente DeMarco et al. (2010) demonstraram que a disfunção endotelial do modelo de MCT está associada a hipóxia e inflamação do tecido pulmonar. O processo inflamatório age como ativador do sistema xantina oxidase (XO) que aumenta a atividade da  $NOX_2$ , proteína acoplada à NADPH oxidase que também é ativada pela redução da produção de NO decorrente da redução de eNOS. Por sua vez, a NADPH oxidase estando mais ativa aumenta a produção de ERO.

Diversos autores (PICHARDO et al., 1999; FARAHMAND et al. 2003; SOUZA-RABBO et al., 2008) têm relacionado a fisiopatologia da HAP induzida por MCT à produção aumentada de ERO e estresse oxidativo. Farahmand et al. (2003) observaram importante hipertrofia e dilatação do VD ao longo de 6 semanas de experimento, bem como aumento da atividade de enzimas antioxidantes envolvidas tanto na dismutação do ânion radical superóxido (SOD) como na redução do peróxido de hidrogênio (CAT e GSHPx) à água 14 dias após injeção de MCT. Anteriormente, já se havia demonstrado que aos 21 dias após MCT a 60 mg/kg não havia alteração na atividade dessas mesmas enzimas, mas uma depleção na concentração de tocoferol associada a aumento da lipoperoxidação (PICHARDO et al., 1999).

Este modelo também é caracterizado pela elevação nos níveis de superóxido tanto no tecido pulmonar como no ventrículo direito (KAMEZAKI et



al., 2008; CSISZAR et al., 2009). Estudos têm demonstrado que a terapia antioxidante pode atenuar o desenvolvimento de HAP em modelos de MCT. A inoculação intra-traqueal de adenovírus contendo o gene humano para SOD extracelular pode atenuar o desenvolvimento de HAP (KAMEZAKI et al., 2008). A administração intraperitoneal de EUK-134, um SOD/Catalase mimético, também reduziu o estresse oxidativo, fibrose intersticial e sinalização proapoptótica com melhora da função do VD, sem que se saiba, no entanto, a ação sobre o ventrículo esquerdo (REDOUT et al., 2010). Também foi demonstrado que o antioxidante resveratrol diminui a infiltração de leucócitos na vasculatura pulmonar, proliferação de células musculares lisas na artéria pulmonar, estresse oxidativo induzido pela NADPH oxidase e previne o desenvolvimento de HAP e hipertrofia de VD (CSISZAR et al., 2009).

No entanto, apesar dos extensos estudos utilizando esse modelo, os mecanismos fundamentais responsáveis pelo desenvolvimento e progressão da insuficiência cardíaca não estão completamente elucidados. Visto que esses achados relacionam fortemente o aumento da produção de ERO, tanto ao remodelamento das arteríolas pulmonares quanto a hipertrofia e insuficiência ventricular direita, o conhecimento do processo oxidativo envolvido no desenvolvimento da HAP é primordial para que se possam propor potenciais terapias antioxidantes. No entanto, há uma grande lacuna no conhecimento das repercussões desse modelo experimental sobre o ventrículo esquerdo e sua relação com o estado oxidativo.

## **2 HIPÓTESE**

Uma injeção única de monocrotalina, em ratos machos Wistar, promove um processo inflamatório pulmonar em 7 dias, que conduz a um dano oxidativo pulmonar, capaz de contribuir para o desenvolvimento da HAP, com consequente desencadeamento de insuficiência cardíaca direita e, aos 31 dias, alterações bioquímicas e funcionais no ventrículo esquerdo.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar alterações estruturais e de estresse oxidativo tempo-dependentes produzidas pela monocrotalina sobre o pulmão e sua repercussão tardia na função cardíaca ventricular esquerda.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Induzir experimentalmente HAP através da administração de monocrotalina;
- Analisar a resistência arterial pulmonar por meio de ecocardiograma em distintos tempos experimentais;
- Avaliar a morfometria pulmonar de maneira qualitativa e quantitativa por meio de esteriologia;
- Determinar a atividade da mieloperoxidase, da catalase, assim como a produção de radical superóxido em homogeneizado de tecido pulmonar;
- Analisar a lipoperoxidação e a carbonilação das proteínas do homogeneizado pulmonar em diferentes momentos;
- Analisar a função ventricular esquerda por meio de ecocardiograma em distintos tempos experimentais;
- Determinar as concentrações de peróxido de hidrogênio no ventrículo esquerdo em distintos tempos experimentais;
- Verificar o balanço redox (GSSG/GSH), níveis de vitamina C e atividade da enzima tioredoxina redutase em homogeneizado de ventrículo esquerdo em distintos tempos experimentais.

## 4 METODOLOGIA

Os procedimentos experimentais de nosso estudo foram divididos em 2 momentos distintos, sendo a primeira etapa direcionada a análise pulmonar e a segunda para análise cardíaca. Assim, o capítulo de metodologia será esquematizado respeitando essa ordem, apresentando inicialmente as análises comuns e posteriormente àquelas que foram específicas de cada etapa.

### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, com peso médio de  $170 \pm 30$  g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Suprilab da Faculdade Adventista da Bahia, sendo mantidos em caixas plásticas de 270 x 260 x 310 mm, com quatro ratos cada, tendo o assoalho recoberto com serragem. Receberam alimentação e água à vontade e foram mantidos sob períodos de 12 horas claro/escuro e sob temperatura de 22°C.

#### 4.1.1 Dimensionamento Amostral

O dimensionamento amostral, para calcular o tamanho da amostra, foi realizado com auxílio do software *Statdisk* tomando-se por base dados da literatura em estudos semelhantes (LIBERA et al., 1999; VESCOVO et al., 2002; ENGEL et al., 2004; GU et al., 2008). O resultado do dimensionamento nos indicou um n com poder estatístico de 4,58 com arredondamento para 5 animais por grupo, mas em virtude do tratamento utilizado apresentar alta mortalidade conhecida durante o protocolo experimental, utilizamos um n de 8 animais por grupo.

#### 4.1.2 Aspectos éticos da pesquisa

Todos os procedimentos do protocolo seguiram as recomendações do Comitê Internacional de Cuidado ao Uso de Animais (NIH Pub. No. 85-23,

Revisado 1996) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Feira de Santana.

#### **4.2 Descarte dos resíduos biológicos e biossegurança**

As carcaças dos animais mortos foram encaminhadas pelo Núcleo de Pesquisa Experimental à empresa terceirizada Suprilab, responsável pelo serviço de coleta de materiais contaminados, conforme rotina da Faculdade Adventista da Bahia.

Todos os procedimentos com os animais e análises posteriores foram feitos com uso de avental, luva cirúrgica e máscara, se necessário, respeitando os devidos cuidados para proteção tanto dos animais como do pesquisador.

#### **4.3 Indução da hipertensão pulmonar**

Os animais dos grupos monocrotalina receberam dose única de 60 mg/kg de peso de animal da droga que foi administrada por injeção intraperitoneal, enquanto que os animais do grupo controle receberam injeção intraperitoneal de solução fisiológica (0,9% P/V). O efeito que se tem obtido com administração de MCT nessa concentração leva às características clínicas similares às da hipertensão pulmonar idiopática em humanos, em duas a três semanas após a injeção (KAY et al., 1982; ECARNOT-LAUBRIET et al., 2002).

#### **4.4 Cálculo do índice de hipertrofia cardíaca**

O índice de hipertrofia cardíaca oferece uma noção do aumento da massa muscular do coração, sendo essa uma característica importante a ser ressaltada na insuficiência cardíaca. Este é calculado pela razão do peso da câmara, em gramas, pelo peso corporal multiplicado por cem e expresso em porcentagem (SKÚLADÖTTIR et al., 1994).

$$\text{IH \%} = [\text{peso da câmara cardíaca (em grama)} / \text{peso corporal (em grama)}] \times 100$$

#### 4.5 Ecocardiograma

Sob efeito anestésico, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo (45°) para obtenção das imagens cardíacas. Foi utilizado o sistema EnVisor Philips (Andover, MA, USA), com um transdutor de alta frequência e alta resolução (12-13 MHz), a 2 cm de profundidade, imagem fundamental e harmônica. As medidas foram efetuadas sempre por um operador treinado e experiente para análises ecocardiográficas em ratos.

Resistência vascular pulmonar (Razão AT/ET). A resistência vascular pulmonar foi avaliada através da razão do tempo de aceleração (AT) pelo tempo de ejeção (ET) no perfil de fluxo da artéria pulmonar (JONES et al., 2002).

Dimensões do VE. As áreas transversais (cm<sup>2</sup>) sistólicas e diastólicas finais foram obtidas pelo traçado da borda endocárdica em 3 níveis: basal (extremidade dos folhetos da valva mitral), medial (ao nível do músculo papilar) e apical (porção distal a partir do músculo papilar, mas anterior à curva final da cavidade) (NOZAWA et al., 2006). Os diâmetros (cm) sistólico e diastólico finais foram mensurados nos planos basal, medial e apical utilizando o modo-M. Uma média dos 3 planos foi calculada e expressa em centímetros.

Função sistólica do VE. A mudança de área fracional (FAC) foi calculada pela diferença da área diastólica e sistólica dividido pela área diastólica. A fração de encurtamento foi obtida pela diferença do diâmetro diastólico e diâmetro sistólico dividido pelo diâmetro diastólico multiplicado por 100.

Função diastólica do VE (Razão E/A). A função diastólica do VE foi determinada por meio da razão da velocidade máxima de enchimento do VE no início da diástole (pico E) pela velocidade máxima de enchimento do VE durante a contração atrial (pico A) (CURY et al., 2005).

Índice de performance miocárdica (PMI). O índice de performance miocárdica foi obtido através do perfil do traçado do fluxo por Doppler como expresso pela equação que segue:  $PMI = (\text{tempo de fluxo na mitral} - \text{tempo de ejeção aórtica}) / \text{tempo de ejeção aórtico}$  (CURY et al., 2005).

## **4.6 ETAPA 1 – Procedimento experimental para análise dos pulmões**

### 4.6.1 Grupos experimentais

Foram utilizados quatro grupos experimentais (n=8/grupo, com número total de 32 animais), sendo eles:

- Grupos controle 7 e 21 dias – Receberam injeção intraperitoneal de solução fisiológica.
- Grupos monocrotalina 7 e 21 dias – Receberam injeção intraperitoneal de MCT a 60 mg/kg.

### 4.6.2 Seqüência experimental

Após injeção de MCT (7 e 21 dias) os animais foram anestesiados com quetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), para realização da ecocardiografia e em seguida os animais foram traqueostomizados, para posterior fixação em formaldeído, e mortos por exsanguinação. Nesse momento, foram coletados os pulmões e o coração, sendo parte dos pulmões separada para histologia e o restante congelado a -80°C para posterior análise. Os corações foram pesados para cálculo do índice de hipertrofia. O tipo de anestesia proposto, com utilização da combinação de quetamina (analgésico) e xilazina (relaxante muscular).

#### 4.6.3 Preparação histológica do pulmão

O pulmão foi retirado, lavado em solução fisiológica, fixado em formaldeído 10% e depois desidratados em bateria de alcoóis, xilol. Após, as peças foram cortadas e submetidas a dois banhos de parafina antes do emblocamento final. Os blocos foram cortados a 5  $\mu\text{m}$  e coloridos por hematoxilina e eosina para posterior análise em microscópio ótico (NAGATO et al., 2009).

#### 4.6.4 Estereologia de pulmão

A fim de obter amostras uniformes e proporcionais de pulmão, do lobo inferior do pulmão direito, 18 campos (seis campos em três lâminas diferentes) foram randomicamente analisados com o uso de um microscópio Zeiss de vídeo-Axioplan equipado com uma objetiva  $\times 20$  (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e uma câmera de vídeo (Trinitron; Sony, San Diego, CA, EUA) conectado a um monitor colorido (Trinitron; Sony). Um sistema de teste (16 arcos ciclóides e 16 pontos) foi sobreposto ao monitor, e o volume de referência foi estimado pela contagem de pontos. Os pontos coincidentes com o septo alveolar ou alvéolos foram contados para estimar a densidade de volume de estas estruturas. Uma área total de 1,94  $\text{mm}^2$  foi analisada, a fim de determinar a densidade de volume do septo alveolar e alvéolos nas lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Dois pesquisadores contaram os campos, não identificados, em diferentes momentos (VLAHOVIC et al., 1999; VALENÇA et al., 2006).



#### 4.6.5 Análises bioquímicas nos pulmões

##### *a) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)*

O ácido tiobarbitúrico reage com lipídios oxidados, gerando malondialdeído (MDA) responsável pela formação de subprodutos da lipoperoxidação. Foram coletadas 500µL de homogeneizado e esse conteúdo foi adicionado de 500µL de TCA (ácido tricloroacético) (10% P/V), agitado e acondicionado em gelo picado durante 15 minutos. Após centrifugação de 3.000g por 10 minutos, o sobrenadante foi incubado com uma solução de 300µL de ácido tiobarbitúrico 0.67% (P/V) por 1 hora a 90°C. O conteúdo foi lido a 532 nm por leitor de microplaca (Bio-Rad model 550; Hercules, CA, USA) O resultados foram expressos em nmol/mg proteína (DRAPER; HADLEY, 1990).

##### *b) Técnica de oxidação de proteínas (Carbonilas)*

A avaliação das carbonilas consiste na reação da dinitrofenilhidrazina (DNPH) com as carbonilas das proteínas formando hidrazonas que podem ser medidas espectrofotometricamente. Foi colocado 0,8 mL de DNPH com 0,2 mL de homogeneizado em um tubo para que ocorresse reação do DNPH com as carbonilas da amostra. Os tubos foram incubados por uma hora, no escuro, e agitados a cada quinze minutos. Após foi adicionado 1 mL de solução de TCA 20% (P/V) nos tubos, foram colocados no gelo por 10 minutos e centrifugados por cinco minutos em centrífuga refrigerada a 3000 rpm. Em seguida, adicionou-se ao precipitado 0,8 mL de TCA 10% (P/V) e se agitou mecanicamente com bastão de vidro. O material foi precipitado por três vezes com 0,8 mL de etanol – acetato de etila (proporção 1:1) para remover o DNPH

livre e lipídios contaminantes. O precipitado final foi dissolvido em 0,4 mL de guanidina 6M e agitado por 10 minutos à 37 °C. Removeu-se o material insolúvel por centrifugação adicional. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro a 360 nm e o resultado expresso em nmol/mg de proteína (REZNICK; PACKER, 1994).

*c) Mieloperoxidase (MPO)*

A atividade da MPO foi medida usando peróxido de hidrogênio, brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB), and 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) (CIGREMIS et al., 2006). Inicialmente 100 µL de homogeneizado foram centrifugados (14,000×g, 15 min) com 900 µL de HTBA. Setenta e cinco µL do sobrenadante foram incubados com 5 µL de TMB (5 min, 37°C). A mistura foi incubada com 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 min, 37°C), após 125 µL de tampão de acetato de sódio/ácido acético ser acrescentado. A reação foi lida em leitor de microplaca (Bio-Rad mod 550, Hercules, CA) a 630 nm. O método foi padronizado com diferentes concentrações de MPO. A atividade da MPO foi expressa em µmol/mg proteína (SUZUKI et al., 1983).

*d) Determinação de ânion superóxido pela reação com Nitroblue Tetrazolium (NBT)*

A detecção de superóxido foi feita por meio do protocolo para NBT adaptado. A técnica se baseia na reação do sal azul de nitrotetrazolium com espécies reativas de oxigênio. Aproximadamente 90% desse sal faz reação exclusivamente com anion superóxido. Outras espécies reativas que reagem com esse sal são o radical hidroxila, peróxido de hidrogênio, o ácido hipocloroso. O ensaio foi realizado em duplicata. Após centrifugar o

homogeneizado 10 min. a 3.000 rpm, se ressuspenderam as células em 100 µL de PBS e em seguida foi adicionado 100 µL de NBT na concentração de 0,1%. Incubou-se em estufa a 37°C por 45 min e depois foi centrifugado a 600 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 µL de PBS (repetiu-se esse processo duas vezes). Após, adicionou-se 200 µL de solução KOH+DMSO (1.800 µL de 2 mol/L KOH + 2.100 µL de DMSO), misturou-se e foi lido em placa de ELISA a 630 nm. A produção de superóxido é expressa em ng de formazan/mg de proteína (CHOI et al., 2006).

#### *e) Atividade da catalase*

O ensaio consiste em medir a diminuição da absorbância do peróxido de hidrogênio a 240 nm. A medida espectrofotométrica consiste em colocar nas cubetas o meio de reação (solução reguladora de fosfato 50 mmol/L - pH 7,2) com 30 µL do homogeneizado de pulmão. Logo, foram agregados 20 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300 mol/L), o que resulta numa concentração final de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 2 mmol/L. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína (AEBI, 1984).

#### *f) Quantificação de Proteínas*

A concentração de proteínas no homogeneizado de pulmão foi estimada pelo método de Bradford, usando solução de albumina bovina como padrão (BRADFORD, 1976).

## 4.7 ETAPA 2 – Procedimento experimental para análise dos corações

### 4.7.1 Grupos experimentais

Foram utilizados seis grupos experimentais (n=8/grupo, com número total de 48 animais), sendo eles:

- Grupos controle 7, 21 e 31 dias – Receberam injeção intraperitoneal de solução fisiológica.
- Grupos monocrotalina 7, 21 e 31 dias – Receberam injeção intraperitoneal de MCT a 60 mg/kg.

### 4.7.2 Seqüência experimental

Após injeção de MCT (7, 21 e 31 dias), os animais foram anestesiados com quetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), para realização da ecocardiografia e em seguida os animais foram traqueostomizados e mortos por exsanguinação. Nesse momento foram coletados os pulmões e corações. Os pulmões foram lavados em solução fisiológica, pesados e desidratados em estufa a 80 °C por 72h para repesagem e cálculo de congestão pulmonar. Os corações foram dissecados e suas câmaras pesadas separadamente para cálculo do índice de hipertrofia, após foram congelados a -80°C para posterior análise.

### 4.7.3 Análises Bioquímicas no Coração

a) *Determinação da concentração da glutathiona total (GSH) e reduzida (GSSG)*

Na determinação da glutathiona total, o tecido ventricular esquerdo foi desproteinizado com ácido perclórico 2 mol/L e centrifugado por 10 min a 1000

g. O sobrenadante foi neutralizado com hidróxido de potássio 2 mol/L. O meio de reação conteve tampão fosfato 100 mmol/L (pH 7.2), NADPH 2 mmol/L, glutationa redutase 0.2 U/mL, 5,5' ditiobis (2-nitro ácido benzóico) 70  $\mu$ mol/L. Na determinação da glutationa reduzida, o sobrenadante neutralizado reage com 5,5' ditiobis (2-nitro ácido benzóico) 70  $\mu$ mol/L, a leitura foi efetuada a 420 nm. Os resultados foram expressos em mmol/L (AKERBOOM; SIES, 1981).

*b) Atividade da tioredoxina redutase (TrxR)*

A atividade da tioredoxina redutase foi medida *in vitro* pela redução do DTNB em ácido 5'-tionitrobenzoico (TNB). Sucintamente, o homogeneizado de coração foi centrifugado a 1000g, e 10  $\mu$ L de sobrenadante foi adicionado a 990  $\mu$ L da mistura de reação (0,25 mmol/L DTNB; 0,24 mmol/L NADPH; 10 mmol/L EDTA e 100 mmol/L tampão fosfato, pH 7.5). A conversão de DTNB à TNB foi mensurada espectrofotometricamente a 412 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg proteína (HOLMGREN; BJÖRNSTEDT, 1995).

*c) Medida de peróxido de hidrogênio*

O método está baseado na oxidação do vermelho de fenol pelo peróxido de hidrogênio mediado pela peroxidase de rabanete, resultando num produto que absorve em 610 nm. O tecido foi picotado e incubado por 30 min em tampão fosfato 10 mmol/L (NaCl 140 mmol/L e dextrose 5mmol/L). O sobrenadante foi coletado e adicionado na solução tampão de vermelho de fenol 0,28 mmol/L e peroxidase de rabanete 8,5 U/mL. Após o intervalo de 5 minutos, adicionou-se NaOH 1N e efetuada a leitura a 610 nm. O resultados foram expressos em nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg de proteína (PICK; KEISARI, 1980).

#### *d) Concentração de ácido ascórbico (vitamina C)*

Para determinar a concentração de ácido ascórbico, as amostras foram incubadas por 20 min a 25°C com ácido tungstico (1,36 mol/L). Esse reagente consiste da suspensão de tungstato de sódio e fosfato de sódio monoácido em água deionizada. Ácido sulfúrico concentrado foi adicionado lentamente, e a solução foi aquecida por 2 horas com um condensador de refluxo para prevenir a formação de bolhas, e então, a solução foi resfriada. Essa mistura foi centrifugada por 10 min a 3000 rpm. Os valores de absorvância do sobrenadante e da solução padrão de vitamina C (diluído 50 mmol/L em solução de ácido oxálico 5%) foi medido a 700 nm. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol/L}$  (KYAW, 1978).

#### *e) Quantificação de proteínas*

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry (1951), que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL. A medida foi efetuada em espectrofotômetro a 625 nm e os resultados expressos em mg/mL.

### 4.8 Análise estatística

Com base nos resultados das análises, foram calculadas as médias e o erro padrão da média para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. A comparação das médias foi feita por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou  $p < 0,05$ . As correlações entre duas variáveis foram analisadas por correlação de Pearson. O software Sigma Plot Software (Systat Software, Inc. –

Illinois, Chicago, USA) foi utilizado como ferramenta computacional para análise estatística dos dados.

## 5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo estão apresentados na forma de dois artigos, sendo eles: *“Time course of histological changes associated with oxidative stress in lungs of pulmonary arterial hypertensive rats”*, a ser submetido à publicação, e o artigo *“Association of the time course of pulmonary arterial hypertension with changes in oxidative stress in the left ventricle”* já aceito para publicação pela revista *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* sob o DOI: 10.1111/j.1440-1681.2011.05608.x.

### **5.1 Artigo I: Time course of histological changes associated with oxidative stress in lungs of pulmonary arterial hypertensive rats.**

Neste artigo é demonstrada a progressiva repercussão da hipertensão arterial pulmonar induzida por MCT sobre o estado redox e histologia pulmonar nos tempos 7 e 21 dias após injeção de monocrotalina.



**Time course of histological changes associated with oxidative stress in lungs of pulmonary arterial hypertensive rats**

Leichsenring-Silva F<sup>1,2</sup>; Neto LAS<sup>2</sup>; Santos WA<sup>2</sup>; Tavares AMV<sup>1</sup>; Mosele F<sup>1</sup>; Pires KM<sup>3</sup>; Valença SS<sup>3</sup>; Llesuy S<sup>4</sup>; Belló-Klein A<sup>1</sup>.

1 - Cardiovascular Physiology Laboratory, Physiology Department, Basic Health Sciences Institute at Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

2 – Experimental Research Center, Bahia Adventist College.

3 - LABCOM, Institute of Biological Sciences. Rio de Janeiro Federal University. Rio de Janeiro - Brazil.

4 - Cátedra de Química Geral y Inorgánica, Facultad de Farmácia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Short title: Pulmonary histological and oxidative changes in PAH

Corresponding author: Dr. Adriane Belló-Klein

Rua Sarmento Leite, 500.

CEP: 90050-170 – Porto Alegre – RS - Brazil

Email: [belklein@ufrgs.br](mailto:belklein@ufrgs.br)

Telephone: 552151 33083621

Fax: 552151 33083656

**ABSTRACT**

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a pre-capillary hemodynamic syndrome, which increases pulmonary vascular resistance. Morphological and oxidative lung changes were explored at 7 and 21 days after induction of PAH by injection of monocrotaline (MCT) 60 mg/kg i.p. Male Wistar rats were divided into four groups: controls 7 and 21 days and MCT 7 and 21 days. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein carbonylation, nitroblue tetrazolium (NBT), myeloperoxidase (MPO) and catalase (CAT) were analyzed in lung homogenates. Cardiac morphometry was explored and pulmonary artery vascular resistance verified by echocardiography. Our findings showed increased RV hypertrophy in MCT 21d group, accompanied by increased pulmonary artery resistance in both MCT groups compared to controls. It was shown a reduction in lung density associated with an increased alveolar space in MCT 21d group. It was observed an increase ( $P < 0.01$ ) in MPO in the MCT 7d and 21d ( $321.35 \pm 23.43$  and  $343.70 \pm 25.67$ , respectively) compared to controls ( $179.09 \pm 28.70$  and  $201.33 \pm 33.14$ ). Protein concentration was significantly increased in both MCT groups. NBT was also increased ( $P < 0.05$ ) in both MCT groups ( $1.05 \pm 0.04$  and  $0.89 \pm 0.05$  versus  $0.57 \pm 0.06$  and  $0.67 \pm 0.05$ ). An increase of TBARS ( $P < 0.05$ ) was noticed in MCT 21d group ( $1.20 \pm 0.08$  nmol/mgprot) versus control ( $0.51 \pm 0.05$  nmol/mgprot), while protein carbonylation did not change. CAT increased ( $P < 0.05$ ) in MCT 21d group ( $22.04 \pm 0.91$ ) in relation to its control ( $10.55 \pm 1.21$ ). The data suggest that oxidative stress markers are altered early before the structural changes take place. These changes may contribute to lipid peroxidation and histological impairment found at 21 days.

Keywords: Pulmonary arterial hypertension, monocrotaline, oxidative stress, lung histology.

## INTRODUCTION

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a severe disease, frequently a fatal disease. It is characterized by the elevation of mean pulmonary artery pressure greater than 25 mmHg at rest or greater than 30 mmHg at exercise, with consequent increase in right ventricle afterload and may lead to hypertrophy of the right ventricle (RV) and progression to heart failure (ROSENZWIG et al., 2004; SIMONNEAU et al., 2009). Its pathophysiology is based on a vascular remodeling that involves changes in the three layers of the pulmonary arterioles wall. These changes include endothelial dysfunction with release of vasoactive mediators, growth factors and cytokines, hypertrophy of smooth muscle cells, fibroblast proliferation, extracellular matrix deposition and differentiation of myofibroblasts (FREDENBURGH et al, 2009).

Several mechanisms play an important role in the development and maintenance of PAH, being mediated by one or more molecular and cellular processes. These processes involve decreased synthesis of prostacycline and nitric oxide (NO) in endothelial cells, as well as high levels of endothelin-1 (MICHAEL et al., 2009). Increased generation of reactive oxygen species (ROS), altered redox state and elevated oxidative stress in lungs and right ventricle (RV) was demonstrated in the animal model of monocrotaline (MCT)-induced PAH (DE MARCO et al., 2010). Lung represents a unique tissue for oxidative stress for its exposition to higher oxygen partial pressure than other organs. This condition determines increased ROS generation.

The animal model of PAH induced by MCT produces a rapid and severe pulmonary vascular disease, being an excellent choice for the study of this disorder (BARMN et al., 2009). MCT causes endothelial injury of the pulmonary arterioles with subsequent proliferation of vascular smooth muscle cells, infiltration of inflammatory cells and platelet activation resulting in PAH and pulmonary vascular remodeling (TAWARA et al., 2007). Rats injected with MCT experience a rapid intrapulmonary inflammation response within 8-16 h after injection (WILSON et al., 1989). Hyperplasia of the middle layer of the vessels and consequent thickening of the wall leads to obstruction of blood flow by luminal compression, being responsible for the high pressure in the pulmonary vascular tree (SULLIVAN et al, 2003).

Although not fully understood, the proposed action mechanism of MCT includes the activation of the crude alkaloid monocrotaline pyrrole in liver, which causes pulmonary endothelial injury (DORFMULLER et al., 2003). This lung tissue damage is

thought to be triggered by superoxide anions production by vasoactive substances and by inflammatory cells derived from MCT administration (KAMEZAKI et al., 2008).

Thus, the objective of this study was to evaluate, in an early and a long-term phase of a rat model mimicking human PAH (MCT-induced), biochemical parameters related to oxidative response in rat lungs and the histological characteristics of the pulmonary microstructure.

## **METHODS**

### **Animals**

Twenty four male Wistar rats weighing  $160\pm 20$ g were used. Experimental animals were housed in a facility at 22-24°C on the 12:12 h light/dark cycle, and had free access to food and water. Animals were weighed weekly to follow body weight gain during the experimental protocol. They were divided into four groups: controls 7 and 21 (receiving a single i.p. saline solution injection) and two MCT groups 7 and 21 days (receiving a single i.p. injection of MCT – Sigma & Aldrich – 60 mg/kg body weight). The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. All animals were treated in accordance with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23, Revised 1996).

### **Experimental protocol**

At the end of the experimental protocol (7 or 21 days), general anesthesia was administered by injection of ketamine i.p. (90 mg/kg) and xylazine i.p. (10 mg/kg) to echocardiographic analysis. After, hearts and lungs were rapidly excised and weighed; the left lung was frozen for biochemical analysis and right lung was prepared for histological analysis. Lung homogenates were prepared (1.15% w/v KCl and phenyl methyl sulfonyl fluoride 20 mmol/L) in Ultra-Turrax. The suspension was centrifuged at 1,000 G for 10 min at 0–4 °C to remove cell debris (LLESUY et al., 1985) and supernatants used for the assays of myeloperoxidase (MPO), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), nitroblue tetrazolium reaction (NBT), catalase activity (CAT), carbonyls and protein concentration.

### **Echocardiography**

Animals underwent echocardiography after 7 and 21 days of treatment. For echocardiography, the animals were placed in a left lateral decubitus position (45° angle) to obtain cardiac imagery. An EnVisor HD System (Philips Medical, Andover, MA, USA) with a 12-13 MHz transducer was used at a depth of 2 cm using

fundamental and harmonic imaging. The images were captured by a trained operator with experience in small animal echocardiography (TAVARES, 2010). The echocardiographic data analyzed were: acceleration time and ejection time through the pulmonary arterial.

### **Stereology**

In order to obtain uniform and proportional lung samples, 18 fields (six non-overlapping fields in three different slides) were randomly analyzed with the use of a Zeiss-Axioplan video microscope fitted with a 20× objective (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and a video camera (Trinitron; Sony, San Diego, CA, USA) connected to a color monitor (Trinitron; Sony). A test system (16 cycloid arches and 16 points) was superimposed on the monitor, and the reference volume was estimated by point counts. The points coinciding with the alveolar septum or alveoli were counted to estimate de volume density of these structures. A total area of 1.94 mm<sup>2</sup> was analyzed in order to determine the volume density of the alveolar septum and the alveoli in the slides stained with hematoxylin and eosin, as well as that of the leukocytes in the slides stained with Giemsa. Two researchers counted the unidentified slides at different times (VALENÇA et al., 2006).

### **Oxidative damage analysis**

Lipid peroxidation was measured by the thiobarbituric acid-reactive substances assay (TBARS) (DRAPER AND HADLEY, 1990). Thiobarbituric acid reacts with malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, to yield a fluorescent product, measured at 532 nm and expressed as MDA equivalents (nmol/mg protein). Protein carbonylation was determined according to the method described by Levine et al. (1990). The protein carbonyl content was measured by first forming labeled protein-hydrazone derivatives using 2,4-dinitrophenylhydrazide (DNPH). These derivatives were extracted with 10% (vol/vol) trichloroacetic acid, which was followed by treatment with a 1:1 (vol/vol) mixture of ethanol/ethylacetate and reextracted with 10% trichloroacetic acid. The resulting precipitate was dissolved in 6 M urea hydrochloride. The difference spectrum between a 2,4-dinitrophenylhydrazide protein blank was used to calculate nmol of 2,4-dinitrophenylhydrazide incorporated per mg of protein. The incorporation was measured 370 nm. Data were expressed in nmol/mg protein.

### **Myeloperoxidase (MPO)**

Myeloperoxidase assay activity was measured by using hydrogen peroxide, hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), and 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB) (CIGREMIS, 2006). Initially, 100 µL of plasma samples were centrifuged with

900  $\mu\text{L}$  of HTAB (14,000 $\times$ g, 15 min). Seventy-five  $\mu\text{L}$  of supernatant was incubated with 5  $\mu\text{L}$  of TMB (5 min, 37°C). The mixture was then incubated with 50  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 min, 37°C), after which 125  $\mu\text{L}$  of sodium acetate buffer was added. The reaction was read in a microplate reader (Bio-Rad mod 550, Hercules, CA) at 630 nm. The method was standardized with different concentrations of MPO. Myeloperoxidase assay activity was expressed in  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein (SUZUKI, 1983).

#### **Nitroblue Tetrazolium reaction (NBT)**

ROS detection was performed following the adapted NBT protocol (CHOI et al., 2006). Briefly, ROS produced by cells reacted with nitro blue tetrazolium chloride (NBT) generating blue formazan. Optical density was read in a microplate reader (Bio-Rad model 550; Hercules, CA, USA) at 630 nm. Data were expressed in ng formazan/mg protein.

#### **Catalase Activity**

Catalase activity was determined by following the decrease in hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) absorbance at 240 nm. It was expressed as nanomole of  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduced per minute per milligram of protein (AEBI, 1984). Data were expressed in U/mg protein.

#### **Protein**

Protein concentration in plasma samples was estimated by Bradford's protocol, using bovine serum albumin (BSA) as a standard (BRADFORD, 1976).

#### **Statistical Analysis**

The data were compared expressed in mean  $\pm$  SEM. The significant differences among measured variables were assessed by two-way analysis of variance, followed by post hoc Tukey test using the Sigma Plot software. Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

## **RESULTS**

#### **Echocardiographic analysis**

Through pulmonary artery flow, it can be seen an increase in ejection time at 7 and 21 days versus its control groups ( $P < 0.05$ ) by 15% and 24%, respectively. A decrease of 43% in acceleration time through the pulmonary artery ( $P < 0.001$ ) in MCT 21 day group when compared to its respective control (Table 1).

#### **Morphometric parameters**

Table 2 summarizes the morphometric characteristics of the animals on the day they were killed. Right ventricle hypertrophy (RV weight to body weight ratio) of MCT day 21 was significantly higher (80%) than its respective control ( $P < 0.001$ ), whereas it

was not in the MCT 7 days group. Left ventricle hypertrophy (left ventricle plus interventricular septum weight to body weight ratio) was unaffected by MCT treatment. The body weight gain was lower in the 7 day, without being significant, while this difference is very significant at 21 days.

### **Stereology**

Stereologic analysis showed significant reduction in volume and surface density of pulmonary tissue of MCT 21 day ( $p < 0.001$ ) when compared with other group, whereas alveolar space was enhanced in MCT 21 day ( $p < 0.001$ ) versus other groups (Table 3).

### **Histology**

In the 7 and 21 days control group, we observed preserved alveolar septa and fully-formed capillaries with normal-size alveoli, without inflammatory infiltrate (Figure 1A and C). In the MCT 7 days group we observed some inflammatory and erythrocyte cells in the alveoli and small infiltrate septa (Figure 1B). Despite these changes, the lung architecture did not change. In the 21 days MCT group observed turgid septa and inflammatory cells in the alveoli were evident (Figure 1D). The image suggests congestion without impairment of the lung architecture.

### **Oxidative stress measurements**

It was observed, in the analysis of homogenized lung tissue, myeloperoxidase (MPO) activity increased by 71% and 78% in the MCT 7 and 21 days groups, respectively ( $P < 0.05$ ) compared to controls (Figure 2). The concentration of proteins in MCT 7 and 21 days groups was significantly higher when compared to their control groups ( $P < 0.05$ ) (Figure 2). A positive correlation between MPO and protein concentration was observed ( $r=0.97$ ;  $P < 0.01$ ).

An increased NBT concentration was seen in the MCT 7 and 21 days groups in relation to their controls by 84% and 33%, respectively ( $P < 0.05$ ) (Figure 3). In the analysis of lipid peroxidation, it was observed an increase in TBARS in the MCT 21 days group in relation to the other groups ( $P < 0.001$ ) (Figure 3). Catalase was also significantly increased in the MCT 21 days group when compared to the other groups ( $P < 0.001$ ) (Figure 3). TBARS and catalase data were also positively correlated ( $r=0.68$ ;  $P < 0.001$ ).

When protein oxidation was explored, it was found no significant changes in carbonylation between MCT ( $6.31 \pm 0.65$ ;  $4.37 \pm 0.73$ ) and control ( $6.64 \pm 0.84$ ;  $4.85 \pm 0.73$ ) groups at 7 and 21 days, respectively.

## DISCUSSION

Besides MCT-induced PAH is a widely used model, just a few studies explored pulmonary oxidative stress, especially concerning the early phase of this pulmonary disease. The novelty of this study was to demonstrate early changes (7 days) in biochemical markers (ROS production) without seeing major histological alterations. When analyzing PAH at 21 days, histological changes, such as reduction in volume density and surface, as well as increasing the alveolar space were noticed. Those changes were associated to pulmonary oxidative damage to lipids and an adaptive response of the antioxidant enzyme catalase.

The model of PAH induced by MCT has been used to cause endothelial injury of pulmonary vasculature, causing a precapillary remodeling and reproducing progressive severe PAH, clinically observed (DUMITRASCU et al., 2008). Reduction of the time of acceleration associated with the increased of the time of ejection of blood through the pulmonary artery have been classically observed in experimental models of PAH (KATO et al., 2003). Our echocardiographic results showed an increase in the time of blood ejection through the pulmonary artery already at 7 days after injection of MCT. This process progresses during the experimental protocol, culminating with a reduced flow acceleration time at 21 days. These data suggest an increase in right ventricular afterload (RV) possibly secondary to the increase of pulmonary vascular resistance (LEICHSENING-SILVA et al., 2011).

The model of PAH by the administration of MTC produces thickening of the medium tunic of arterioles, leading to increased pulmonary arterial resistance (CSISZAR et al., 2009) and that the compensatory adaptive response to this increase in RV afterload is observed anatomically by RV hypertrophy, however, with no change in LV hypertrophy. These morphometric features were seen in our study. Another significant finding in our study was the reduction in weight gain of animals MCT. Mice that develop PAH in MCT models have showed characteristics of anorexia resulting in lower gain, or even decrease of body weight in relation to their controls (KATO et al., 2003; MARUYAMA et al., 2007).

In the histological analysis, it can be seen, in MCT 7 days group, a small infiltrate septa and normal-size alveoli. In the MCT 21 days group, turgid septa can be observed, with inflammatory cells and erythrocytes in the alveoli with septal thickening, suggestive of congestion. From stereological results, it was observed a reduction of the volume and surface density associated with an increased alveolar space 21 days after administration of MCT, corroborating the histological observations.



Pulmonary inflammatory conditions and cellular lung injury have been associated to increased protein concentration (NAGATO, 2009; FONSECA, 2011). In the model studied, it was also observed an increase in protein concentration not only at 7 but also at 21 days after MCT administration. During inflammatory process, there is an enhanced ROS production, such as superoxide anion (RAHMAN, MACNEE, 2000; CSISZAR et al., 2009). Myeloperoxidase (MPO) is described as a marker of inflammation and oxidative stress (VAN et al., 2000), since it metabolizes hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), producing singlet oxygen and consequently superoxide anion in lungs (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). The strong correlation between MPO activity and protein lung concentration reinforces the role of these parameters in the inflammatory process. The increased activity of MPO in our study seems to be linked to increased pro-oxidant levels. It can be seen from NBT data, which reflect ROS production, especially superoxide anion. Our results show an increase in lung protein concentration, reaction of NBT and MPO activity in lung homogenates from the seventh day after injection of MCT. Besides these changes in biochemical markers observed, no major histological changes and tissue damage were noticed at seven days. However, the maintenance of elevated ROS concentration will determine lipid peroxidation chain reactions, determining oxidative damage to lipids in later times. Our results demonstrate a clear oxidative damage under lipids (TBARS data), which was not reflected in protein oxidation. The increased lipid peroxidation observed at 21 days may contribute to the histological changes seen at this time-point. Considerable evidence points toward a central role of ROS in lesions that lead to the development of various lung diseases, possibly inducing direct cell injury (HADDAD, 2002; MADGER, 2006).

As an adaptive response of the antioxidant system, catalase is enhanced at 21 days after MCT administration. CAT metabolizes hydrogen peroxide, preventing the formation of the hydroxyl radical in an attempt of avoiding the progression of oxidative stress (MATES et al., 1999). Previous study from our group (LUDKE et al, 2010) have also found an increase in catalase in lung tissue 21 days after the injection of MCT, being associated with a reduction in eNOS protein expression. In other models of pulmonary disease, the induction of catalase is also present as a counter-regulatory response (CARVALHO et al., 2010).

The pulmonary vascular remodeling promoted by MCT has a great impact on heart workload. Increased pulmonary vascular resistance will determine enhanced RV afterload and at long term RV and LV dysfunction. Oxidative stress has a main role in this process. Since the heart dysfunction is subsequent to the pulmonary vasculature

changes and oxidative damage in this tissue, preventing those alterations could be relevant in the therapeutics of PAH.

The findings of this study, in both moments studied after MCT-induced PAH , associated early ROS production followed by tissue oxidative damage and antioxidant adaptation. Additional studies targeting pulmonary oxidative stress at early temporal windows are warranted in order to explore the mechanisms of these answers. This kind of study may contribute to minimize PAH progression and consequent pulmonary and cardiac damage.

### Figure Captions

Figure 1. Histology: A) control 7 days group with preserved alveolar septa (intermittent arrow) normal capillaries and normal-size alveoli [Alv]; B) MCT 7 days group with small infiltrate septa (intermittent arrow) and normal-size alveoli [Alv] with inflammatory (filled arrow) and erythrocyte (dotted arrow) cells in the alveoli; C) control 21 days group with preserved alveolar septa (intermittent arrow) normal capillaries and normal-size alveoli [Alv]; D) MCT 21 days group with turgid septa (intermittent arrow) inflammatory (filled arrow) and erythrocyte (dotted arrow) cells in the alveoli with image suggestive of congestion, with alteration of the lung structure. Microscope fitted with a 40× objective.

Figure 2. Myeloperoxidase activity (MPO) and protein concentration in lung homogenates. The data are expressed as means  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$  compared to the controls. Two-way analysis of variance with post hoc Tukey,  $n = 6$  per group.

Figure 3. Nitroblue Tetrazolium reaction (NBT), Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) and Catalase activity (CAT) in lung homogenates. The data are expressed as means  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$  compared to the controls. \*\*  $P < 0.001$  compared to others groups. Two-way analysis of variance with post hoc Tukey,  $n = 6$  per group.

Table 1. Echocardiographic parameters of pulmonary artery flow evaluated 7 and 21 days after monocrotaline (MCT) or saline (control) injections.

Parameters	Time		
	Day 7	Day 21	
<b>Ejection time (s)</b>	<b>Control</b>	0.103 ± 0.003	0.103 ± 0.002
	<b>MCT</b>	0.119 ± 0.003*	0.128 ± 0.002*
<b>Acceleration time (s)</b>	<b>Control</b>	0.035 ± 0.001	0.035 ± 0.001
	<b>MCT</b>	0.033 ± 0.001	0.020 ± 0.001**

Data expressed in mean±SEM of 6 animals/group. Two-way analysis of variance with post hoc Tukey. \* P < 0.05 vs its control group. \*\* P < 0.001 vs other groups.

Table 2. Morphometric parameters evaluated 7 and 21 days after monocrotaline (MCT) or saline (control) injections.

Parameters		Time	
		Day 7	Day 21
RVH (mg/g)	Control	0.58 ± 0.04	0.49 ± 0.03
	MCT	0.60 ± 0.04	0.88 ± 0.03**
LVH (mg/g)	Control	2.49 ± 0.08	2.15 ± 0.07
	MCT	2.44 ± 0.08	2.26 ± 0.07
Body Weighth Gain (g)	Control	43.12 ± 6.20	79.50 ± 5.55
	MCT	27.50 ± 6.20	28.63 ± 5.29**

Data expressed in mean±SEM of 6 animals/group. Two-way analysis of variance with post hoc Tukey. RVH - Right Ventricle Hypertrophy; LVH - Left Ventricle Hypertrophy. \*\* P < 0.001 vs other groups.

Table 3. Stereology results evaluated 7 and 21 days after monocrotaline (MCT) or saline (control) injections.

Parameters	Time		
	Day 7	Day 21	
Volume density (%)	Control	0.437± 0.024	0.453± 0.016
	MCT	0.497± 0.028	0.378± 0.016**
Surface density (%)	Control	0.037 ± 0.001	0.033 ± 0.001
	MCT	0.037 ± 0.001	0.027 ± 0.001**
Alveolar space (%)	Control	0.563± 0.024	0.547± 0.016
	MCT	0.505± 0.028	0.639± 0.016**

Data expressed in mean±SEM of 6 animals/group. \*\* P< 0.001 vs

other groups. Two-way analysis of variance with post hoc Tukey.

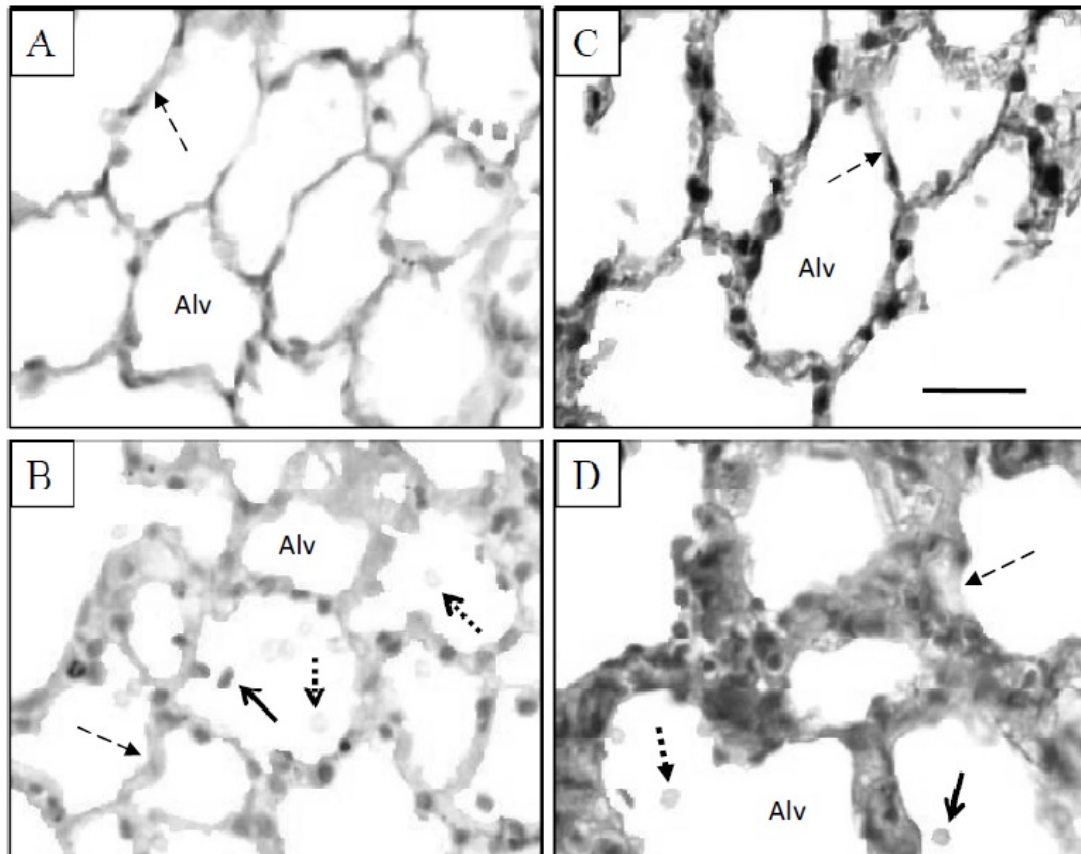


Figure 1.

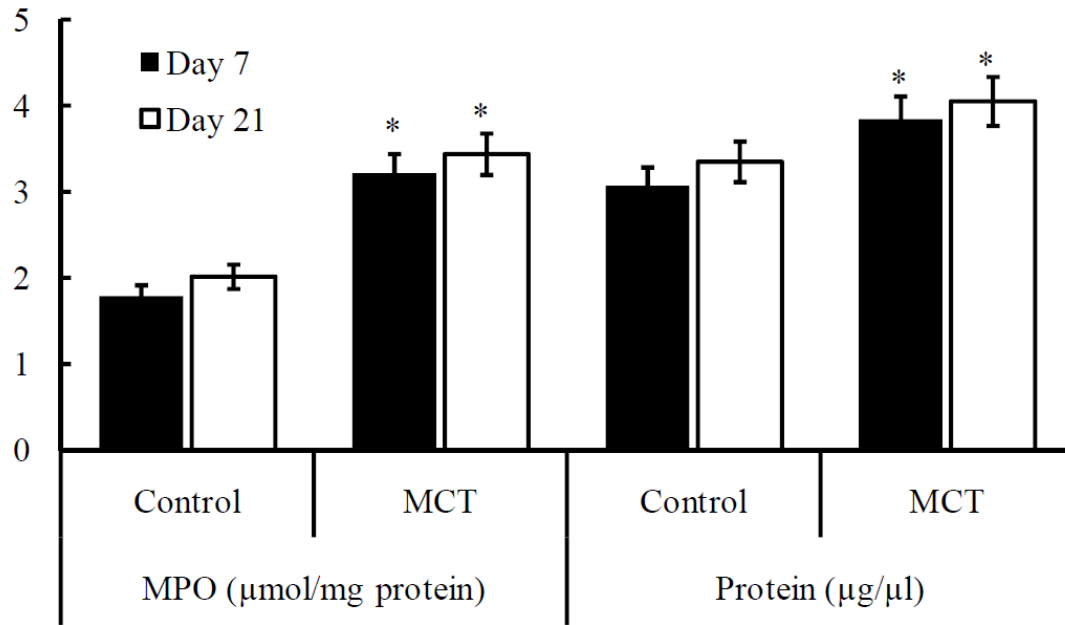


Figure 2.



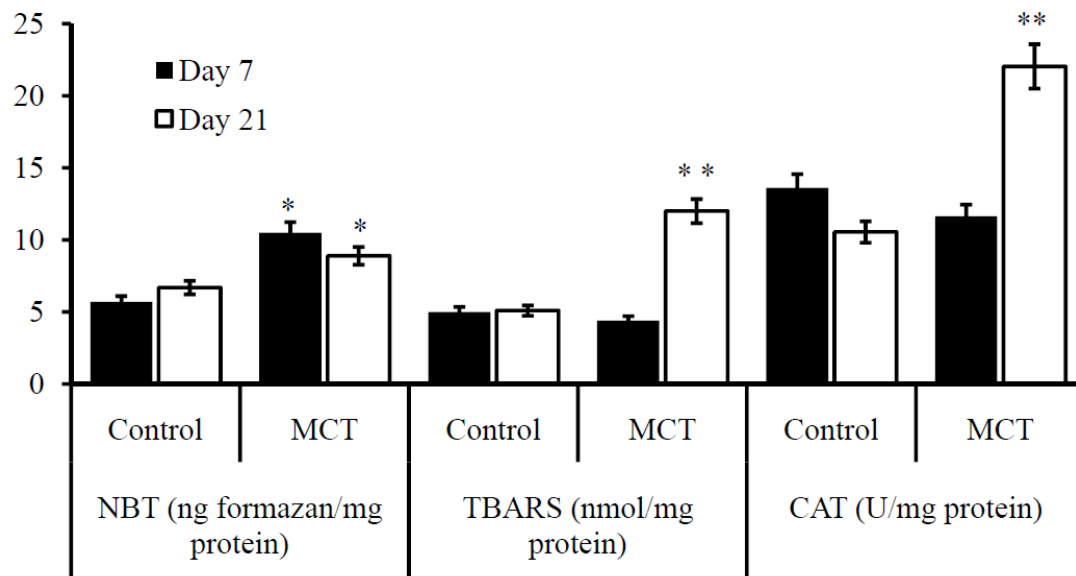


Figure 3.

## REFERENCES

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984, 105:121-126.
- Barmn AS; Zhu S; White RE. RhoA/Rho Kinase signaling: a therapeutic target in pulmonary hypertension. *Vascular Health and Risk Management.* 2009, 5: 663-671.
- Boulden BM; Widder JD; Allen JC; et al. Early determinants of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced endothelial dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 2006, 1;41(5): 810-7.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976, 72: 248-254.
- Bromberg J: Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest.* 2002, 109: 1139-1142.
- Carvalho GMC; Oliveira VR; Soares RM; et al. Can LASSBio 596 and dexamethasone treat acute lung and liver inflammation induced by microcystin-LR? *Toxicon.* 2010, 56: 604–612.
- Choi HS; Kim JW; Cha YN; et al. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J Immunoassay Immunochem.* 2006, 27: 31-44.
- Cigremis Y; Turkoz Y; Tuzcu M; et al. The effects of chronic exposure to ethanol and cigarette smoke on the formation of peroxynitrite, level of nitric oxide, xanthine oxidase and myeloperoxidase activities in rat kidney. *Mol Cell Biochem.* 2006, 291: 127-138.
- Csiszar A; Labinsky N; Olson S; et al. Resveratrol Prevents Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. *Hypertension.* 2009, 54: 668-675.
- DeMarco VG; Habibi J; Whaley-Connell AT; et al. Oxidative stress contributes to pulmonary hypertension in the transgenic(mRen2)<sup>27</sup> rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008, 294: 2659-2668.
- Demarco VG, Whaley-Connell AT, Sowers JR, et al. Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. *World J Cardiol.* 2010, 26;2(10): 316-24.
- Dorfmuller P; Perros F; Balabanian K; et al. Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Eur Respir J.* 2003, 22: 358-363.
- Draper HH; Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990, 186: 421-431.
- Dumitrascu R; Koebrich S; Dony E; et al. Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury. *BMC Pulmonary Medicine.* 2008, (8) 25: 1-15.
- Fredenburgh LE; Jun MA; Perrella MA. COX-2 inhibition and hypoxia-induced pulmonary hypertension: effects on pulmonary vascular remodeling and contractility. *Trends Cardiovasc Med.* 2009, 19(2): 31-37.

- Fonseca AS; Presta GA; Geller M; et al. Low-intensity infrared laser increases plasma proteins and induces oxidative stress in vitro. *Lasers Med Sci.* 2011, Epub ahead of print.
- Haddad J. Science review: Redox and oxygen-sensitive transcription factors in the regulation of oxidant-mediated lung injury: role for nuclear factor- $\kappa$ B. *Critical Care.* 2002, 6: 481-490.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4rd edition. Oxford: Oxford University Press, 2007.
- Heinecke JW. Mechanisms of oxidative damage of low density lipoprotein in human atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 1997, 8(5): 268-74.
- Huang J; Wolk JH; Gewitz MH; et al. Progressive endothelial cell damage in an inflammatory model of pulmonary hypertension. *Exp Lung Res.* 2010, 36(1): 57-66.
- Kamezaki F, Tasaki H, Yamashita K, et al. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase ameliorates pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008, 15;177(2): 219-26.
- Kato Y; Iwase M; Kanazawa H; et al. Progressive development of hypertension pulmonary leading to right ventricular hypertrophy assessed by echocardiography in rats. *Exp anim.* 2003, 52(4): 285-294.
- Leichsenring-Silva F, Tavares A, Mosele F, et al. Association of the time course of pulmonary arterial hypertension with changes in oxidative stress in the left ventricle. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2011, Doi: 10.1111/j.1440-1681.2011.05608.x.
- Levine RL; Garland D; Oliver CN; et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990, 186: 464-478.
- Llesuy SF; Milei J; Molina H; et al. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 40-epiadriamycin in mice. *Tumori.* 1985, 71: 241-49.
- Ludke A; Mosele F; Caron-Lienert R; et al. Modulation of Monocrotaline-Induced *Cor Pulmonale* by Grape Juice. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010, 55(1): 89-95.
- Madger S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Critical Care.* 2006, 10(1): 208-215.
- Matés JM; Pérez-Gomez C; Castro IN. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry.* 1999, 32(8): 595-603.
- Mathew R; Huang J; Shah M; et al. Disruption of endothelial-cell caveolin-1 $\alpha$ /raft scaffolding during development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation.* 2004, 110: 1499-1506.
- Mathew R; Huang J; Gewitz MH. Pulmonary artery hypertension: caveolin-1 and eNOS interrelationship: a new perspective. *Cardiol Rev.* 2007, 15: 143-149.

- Maruyama H; Watanabe S; Kimura T; et al. Granulocyte colony-stimulating factor prevents progression of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Circ J*. 2007, 71(1): 138-43.
- Meyrick B; Reid L. Hypoxia-induced structural changes in the media and adventitia of the rat hilar pulmonary artery and their regression. *Am J Pathol*. 1980, 100: 151-178
- Meyrick BO; Reid LM. Crotalaria-induced pulmonary hypertension. Uptake of 3H-thymidine by the cells of the pulmonary circulation and alveolar walls. *Am J Pathol*. 1982, 106: 84-94.
- Nagato A; Silva FL; Silva AR; et al. Hyperoxia-induced lung injury is dose dependent in Wistar rats. *Exp Lung Res*. 2009, 35(8): 713-28.
- Rahman I; MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J*. 2000, 16: 534-554.
- Rosenzweig EB, Widlitz AC, Barst RJ. Pulmonary arterial hypertension in children. *Pediatr Pulmonol*. 2004, 38:2-22.
- Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009, 30;54(1 Suppl): S43-54.
- Sullivan CC; Du L; Chu D; et al. Induction of pulmonary hypertension by an angiopoietin 1/TIE2/serotonin pathway. *PNAS*. 2003, 100(21): 12331-12336.
- Suzuki K; Ota H; Sasagawa S; et al. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal. Biochem*. 1983, 132: 345-352.
- Tavares AM; da Rosa Araújo AS; Baldo G; et al. Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction. *Life Sci*. 2010, 87: 699-706.
- Tawara S; Fukumoto Y; Shimokawa H. Effects of Combined Therapy With a Rho-Kinase Inhibitor and Prostacyclin on Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007, 50(2): 195-200.
- Valenca SS; Castro P; Pimenta WA; et al. Light cigarette smoke-induced emphysema and NFkappaB activation in mouse lung. *Int J Exp Pathol*. 2006, 87(5): 373-81.
- Vallyathan V; Shi X. The Role of Oxygen Free Radicals in Occupational and Environmental Lung Diseases. *Environ Health Perspect*. 1997, 105(1): 165-177.
- Van Der Vliet A; Nguyen MN; Shigenaga MK; et al. Myeloperoxidase and protein oxidation in cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000, 279(3): L537-46.
- Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, et al. Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res*. 1989, 38(1): 57-80.

## **5.2 Artigo II: Association of the time course of pulmonary arterial hypertension with changes in oxidative stress in the left ventricle.**

Neste artigo apresentamos a condição funcional do coração aos 7, 21 e 31 dias após a indução da hipertensão arterial pulmonar, particularmente analisando o estado redox, antioxidantes e os parâmetros funcionais do ventrículo esquerdo decorrentes do aumento da resistência vascular pulmonar.

## Association of the time course of pulmonary arterial hypertension with changes in oxidative stress in the left ventricle

Fabiano Leichsenring-Silva,\* Angela Maria VicenteTavares,\* Francisca Mosele,\* Bruno Berger,\* Susana Llesuy<sup>†</sup> and Adriane Belló-Klein\*

\*Physiology Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil and <sup>†</sup>Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, Argentina

### SUMMARY

1. This study investigates the time course of pulmonary arterial hypertension (PAH) due to monocrotaline (MCT) and its association with cardiac function and oxidative stress markers in the left ventricle (LV).

2. Male Wistar rats were divided into six groups: 7 days, 21 days, and 31 days for both control and MCT groups. Following echocardiographic analysis, the heart was removed. The LV was separated and homogenized to analyze oxidized-to-total glutathione ratio and thioredoxin reductase (TrxR) activity as well as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and ascorbic acid levels.

3. There was significant ( $P < 0.01$ ) cardiac and right ventricle (RV) hypertrophy and pulmonary congestion in the MCT 21 day and 31 day groups. Echocardiography showed a change in the flow wave of the pulmonary artery at 21 days after MCT treatment. There was an increase in the LV ejection time ( $P < 0.05$ ) at 31 days after MCT. The LV H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration was increased ( $P < 0.05$ ) in the MCT 21 day and MCT 31 day groups compared with controls. There was a reduction ( $P < 0.05$ ) in the LV ascorbic acid concentration and an increase ( $P < 0.05$ ) in TrxR activity in the MCT 31 day rats.

4. Our findings showed RV changes due to pulmonary hypertension at 21 days after MCT injection. There was a correlation between the degree of dysfunction and the morphometry of the heart chambers, along with impairment of the antioxidant/pro-oxidant balance in the LV 31 days after the beginning of the protocol. This study suggests that LV changes follow RV dysfunction subsequent to pulmonary hypertension.

**Key words:** ascorbic acid, Cor pulmonale, glutathione, monocrotaline, right heart failure, thioredoxin reductase.

### INTRODUCTION

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is the diagnosis given to patients with pulmonary hypertension of unknown aetiologies. Patients with PAH present signs and symptoms of right heart failure,

and the prognosis has been recognized as being extremely poor. Although the precise aetiology of PAH remains unknown, the findings of increased pulmonary vascular reactivity and vasoconstrictive tendency underlie the development of PAH.<sup>1</sup>

The impaired cardiac function under these circumstances has been generally attributed to right ventricle (RV) dysfunction. However, the left ventricle (LV) may be involved as well because neurohormonal compensation of depressed cardiac function<sup>2</sup> will typically affect both ventricles. Two distinct forms of mechanical interaction exist: a series interaction because RV output equals LV input,<sup>3</sup> and a direct local interaction in which forces are transmitted over the septum or via the pericardium and are independent of humoral or circulatory effects.

Characteristically, echocardiography has been an important tool in the diagnosis, measurement and monitoring of heart disease, particularly as they relate to right ventricular dysfunction, which may or may not be induced by pulmonary hypertension both in experimental medicine and in clinical follow-up for patients.<sup>4,5</sup>

A single injection of monocrotaline (MCT), a pyrrolizidine alkaloid, causes pulmonary arterial hypertension in rats. This model has several pathological features similar to PAH in humans.<sup>6</sup> MCT induces an increase in pulmonary vascular resistance, leading to an enhanced afterload to the RV, which constitutes a stimulus for RV hypertrophy. MCT produces vascular endothelial cell damage, muscular hypertrophy in pulmonary arteries<sup>7</sup> and increased reactive oxygen species (ROS) production in the RV.<sup>8</sup> The extent of pulmonary hypertension as well as RV hypertrophy induced by MCT administration appears to be correlated with these pulmonary vascular structural changes.<sup>9</sup>

The data suggest that oxidative stress, due to an increased ROS production and/or a decrease in antioxidants, is involved in the pathophysiology of pulmonary arterial hypertension (PAH).<sup>10</sup> Farahmand *et al.*<sup>11</sup> provide strong evidence of a close correlation between the status of the myocardial antioxidant and the RV dysfunction induced by MCT. Pichardo *et al.*<sup>7</sup> also found a reduction in the concentration of  $\alpha$ -tocopherol, a non-enzymatic antioxidant in this experimental model, which was associated with impairing RV function.

Right ventricular disease has received increasing clinical recognition,<sup>12</sup> and RV dysfunction is the major determinant of survival in patients with PAH, regardless of the underlying cause.<sup>13</sup> RV hypertrophy may progress to heart failure, affecting the function of both cardiac chambers. However, there is a paucity of information in the published reports regarding LV function in PAH not only in clinical but also in experimental studies.

Correspondence: Dr Adriane Belló-Klein, Rua Sarmento Leite, 500, CEP: 90050-170 – Porto Alegre – RS – Brazil. Email: belklein@ufrgs.br

Received 18 May 2011; revision 5 September 2011; accepted 12 September 2011.

© 2011 The Authors

Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology

© 2011 Blackwell Publishing Asia Pty Ltd

This study evaluated the progressive development of pulmonary hypertension, leading to RV hypertrophy and failure in rats after MCT administration through echocardiography. Our primary goal was to assess LV function during the transition from hypertrophy to failure by examining oxidative stress changes in this ventricular chamber.

## METHODS

### Animals and MCT treatment

Forty-two male Wistar rats weighing  $160 \pm 20$  g were used. Experimental animals were housed in a facility at 22–24°C on a 12 : 12 h light : dark cycle, and they had free access to food and water. Animals were weighed weekly to track body weight gain during the experimental protocol. They were also divided into six groups ( $n = 7/\text{group}$ ): three controls at 7, 21 and 31 days (receiving a single i.p. saline solution injection) and three MCT groups at 7, 21 and 31 days (receiving a single i.p. MCT injection at a concentration of 60 mg/kg body weight).<sup>11</sup> The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. All animals were treated in accordance with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institute of Health (NIH publication no. 85-23, Revised 1996).

### Experimental protocol

At the end of the experimental protocol (7, 21 or 31 days), general anaesthesia was administered by ketamine (90 mg/kg i.p.) and xylazine (10 mg/kg i.p.) injections for echocardiography. Next, hearts and lungs were rapidly excised, weighed, and frozen for posterior analysis. The heart was weighed without atria. After this, the right ventricle free wall was dissected out and weighed. Left ventricle along with the septum was also weighed. The lungs were weighed to estimate the congestion in these organs in terms of tissue weight to body weight ratio. The concentration of hydrogen peroxide was determined using LV slices. LV homogenates were also prepared (1.15% w/v KCl and phenyl methyl sulfonyl fluoride 20 mmol/L) in Ultra-Turrax. This suspension was centrifuged at 1000 g for 10 min at 0–4°C to remove cell debris,<sup>14</sup> and supernatants were used for the assays to determine the oxidized-to-total glutathione ratio (GSSG/GSH) as well as ascorbic acid and thioredoxin reductase activity.

### Echocardiography

Animals underwent echocardiography before (baseline evaluation) and after 7, 21 and 31 days of treatment. For echocardiography, the animals were placed in a left lateral decubitus position (45° angle) to obtain cardiac imagery. An EnVisor HD System (Philips Medical, Andover, MA, USA) with a 12–13 MHz transducer was used at a depth of 2 cm using fundamental and harmonic imaging. The images were captured by a trained operator with experience in small animal echocardiography.<sup>15</sup>

### Determination of the oxidized-to-total glutathione ratio

To determine the oxidized-to-total glutathione ratio, tissue was deproteinized with 2 mol/L perchloric acid, centrifuged for 10 min at 1000 g, and then the supernatant was neutralized with 2 mol/L potassium hydroxide. The reaction medium contained 100 mmol/L phosphate buffer (pH 7.2), 2 mmol/L nicotinamide dinucleotide phosphate acid, 0.2 U/mL glutathione reductase, and 70 mmol/L 5,5 dithiobis (2-nitrobenzoic acid).<sup>16</sup>

### Ascorbic acid concentration

To determine ascorbic acid concentration, samples were incubated for 20 min at 25°C with tungstic acid reagent. This reagent consists of a suspension of

sodium tungstate and anhydrous sodium hydrogen phosphate in deionized water. Concentrated sulfuric acid was added slowly, and the suspension was heated to dissolve the sulfuric acid. The solution was heated for 2 h with a reflux condenser to prevent it from boiling, and then, the solution was cooled. This mixture was centrifuged for 10 min at 1000 g. Absorbance values of the supernatant and the vitamin C standard solution (diluted in 50 mmol/L oxalic acid solution) were measured at 700 nm.<sup>17</sup> The results were expressed in  $\mu\text{mol}$ .

### Thioredoxin reductase activity

Thioredoxin reductase (TrxR) activity was assayed by an *in vitro* reduction of DTNB to 5'-thionitrobenzoic acid (TNB). Briefly, the samples were centrifuged at 1000 g, and 10  $\mu\text{L}$  of supernatant was added to 990  $\mu\text{L}$  of the reaction mix (0.25 mmol/L DTNB, 0.24 mmol/L NADPH, 10 mmol/L EDTA, and 100 mmol/L phosphate buffer, pH 7.5). The conversion of DTNB to TNB was measured spectrophotometrically at 412 nm. Because several enzymes are able to reduce DTNB, a specific TrxR inhibitor was used to determine the reduction of DTNB due only to TrxR activity.<sup>18</sup> These results were expressed in nmol/mg protein.

### Hydrogen peroxide concentration

Hydrogen peroxide was measured via a horseradish peroxidase (HRPO)-mediated oxidation of phenol red, leading to the formation of a compound measurable at 610 nm. Slices of fresh tissue from the LV were incubated for 30 min at 37°C in phosphate buffer at a concentration of 10 mmol/L (NaCl 140 mmol/L and dextrose 5 mmol/L). The supernatants were transferred to tubes containing 0.28 mmol/L phenol red and 8.5 U/mL HRPO. After incubating for 5 min, 1 mol/L NaOH was added, and the absorbance values of the solution were measured. The results were expressed in nanomoles  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{g}$  tissue.<sup>19</sup>

### Protein concentration determination

The protein concentration was measured by the method of Lowry *et al.*<sup>20</sup> using bovine serum albumin (BSA) as the standard.

### Statistical analysis

The data were compared expressed in mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The significant differences among measured variables were assessed by two-way analysis of variance (ANOVA), followed by post hoc Tukey test using the SIGMA PLOT software (Systat Software, Inc., Illinois, Chicago, USA). The correlation between two variables was analyzed by Pearson's correlation. All *P*-values reported are two-tailed and  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

### Morphometric parameters

Table 1 summarizes the morphometric characteristics of the animals on the day they were killed. Final body weight was lower ( $P < 0.001$ ) in the MCT groups than the controls, starting at day 7. Right ventricle weight to body weight ratio (RVW/BW) of MCT 21 day and MCT 31 day groups was significantly higher than their respective controls ( $P < 0.01$ ), whereas left ventricle plus inter-ventricular septum weight to body weight ratio (LVW/BW) was unaffected by MCT treatment. The degree of cardiac hypertrophy was determined as the heart weight to body weight ratio (HW/BW), this parameter showed an increase ( $P < 0.05$ ) in MCT 21 day rats (by 14%), as well as in MCT 31 day rats (by 59%,  $P < 0.01$ ) (Table 1). Lung congestion was significantly higher ( $P < 0.01$ ) in

**Table 1** Morphometric parameters evaluated 7, 21 and 31 days after monocrotaline (MCT) or saline (control) injections

Time	Group (n)	BW	RVW/BW	LVW/BW	HW/BW	LC
Day 7	Control (8)	227.5 ± 12.2	0.68 ± 0.03	2.4 ± 0.05	3.08 ± 0.19	5.4 ± 0.65
	MCT (8)	182.5 ± 14.1***	0.63 ± 0.04	2.4 ± 0.05	3.03 ± 0.15	7.09 ± 0.87
Day 21	Control (6)	280.8 ± 40.8	0.45 ± 0.02	2.2 ± 0.11	2.65 ± 0.09	5.09 ± 1.08
	MCT (8)	240.6 ± 41.4***	0.83 ± 0.04**	2.2 ± 0.16	3.03 ± 0.29*	9.05 ± 1.89**
Day 31	Control (8)	305.0 ± 24.5	0.55 ± 0.02	2.1 ± 0.07	2.65 ± 0.09	5.87 ± 1.34
	MCT (6)	195.0 ± 39.7***	2.01 ± 0.20**	2.2 ± 0.41	4.21 ± 0.50**	11.21 ± 4.62**

Values are means ± standard error of the mean (SEM). \*Control compared with MCT,  $P < 0.05$ ; \*\*Control compared to MCT,  $P < 0.01$ ; \*\*\*Control compared with MCT,  $P < 0.001$ . Two-way analysis of variance with post hoc Tukey test. BW, body weight (g); HW, heart weight (mg); LC, lung congestion; LVW, left ventricular weight (mg); RVW, right ventricular weight (mg).

MCT 21 day and MCT 31 day rats than in their respective controls (Table 1). RV hypertrophy positively correlated with lung congestion ( $r = 0.68$ ,  $P < 0.01$ ).

### Echocardiographic analysis

#### Pulmonary vascular resistance

Representative echocardiograms of pulmonary artery flow can be seen for the control groups at 7, 21, and 31 days (Fig. 1a–c) and also in the respective MCT groups (Fig. 1d–f). Acceleration-to-ejection time ratio (AT/ET) through the pulmonary artery was reduced ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively) in all MCT groups (7 days, 21 days and 31 days, respectively) when compared with their respective controls (Fig. 2). AT/ET ratios negatively correlated with RV hypertrophy ( $r = -0.76$ ,  $P < 0.01$ ).

#### Left ventricle function

The analyzed parameters were the myocardial performance index and diastolic and systolic functions. The only changes in the analyzed parameters were in the MCT 31 day group.

#### Myocardial performance index

An important increase in this parameter was shown in the MCT 31 day group in relation to its control ( $P < 0.001$ ) (Table 2). A strong positive correlation was found between MPI and RV hypertrophy ( $r = 0.75$ ,  $P < 0.001$ ).

#### Diastolic function

Flow velocity of the E and A waves through the mitral valve was significantly lower ( $P < 0.001$  and  $P < 0.01$ , respectively) in the MCT 31 day group than in respective controls (Table 2). Representative echocardiograms of the mitral flow can be seen for the control groups at 7, 21, and 31 days (Fig. 1g–i), and the same can be seen for the monocrotaline groups (Fig. 1j–l).

#### Systolic function

Systolic and diastolic diameters of the LV showed a reduction ( $P < 0.001$ ) in the MCT 31 day group in relation to their respective control group. The LV posterior wall thickness was found to be enhanced during diastole ( $P < 0.05$ ), and this did not change in sys-

tole. The LV fractional area change (FAC) as well as fractional shortening (LVFS) were augmented ( $P < 0.001$  for both) in the MCT 31 day group as compared with their respective controls.

### Oxidative stress measurements

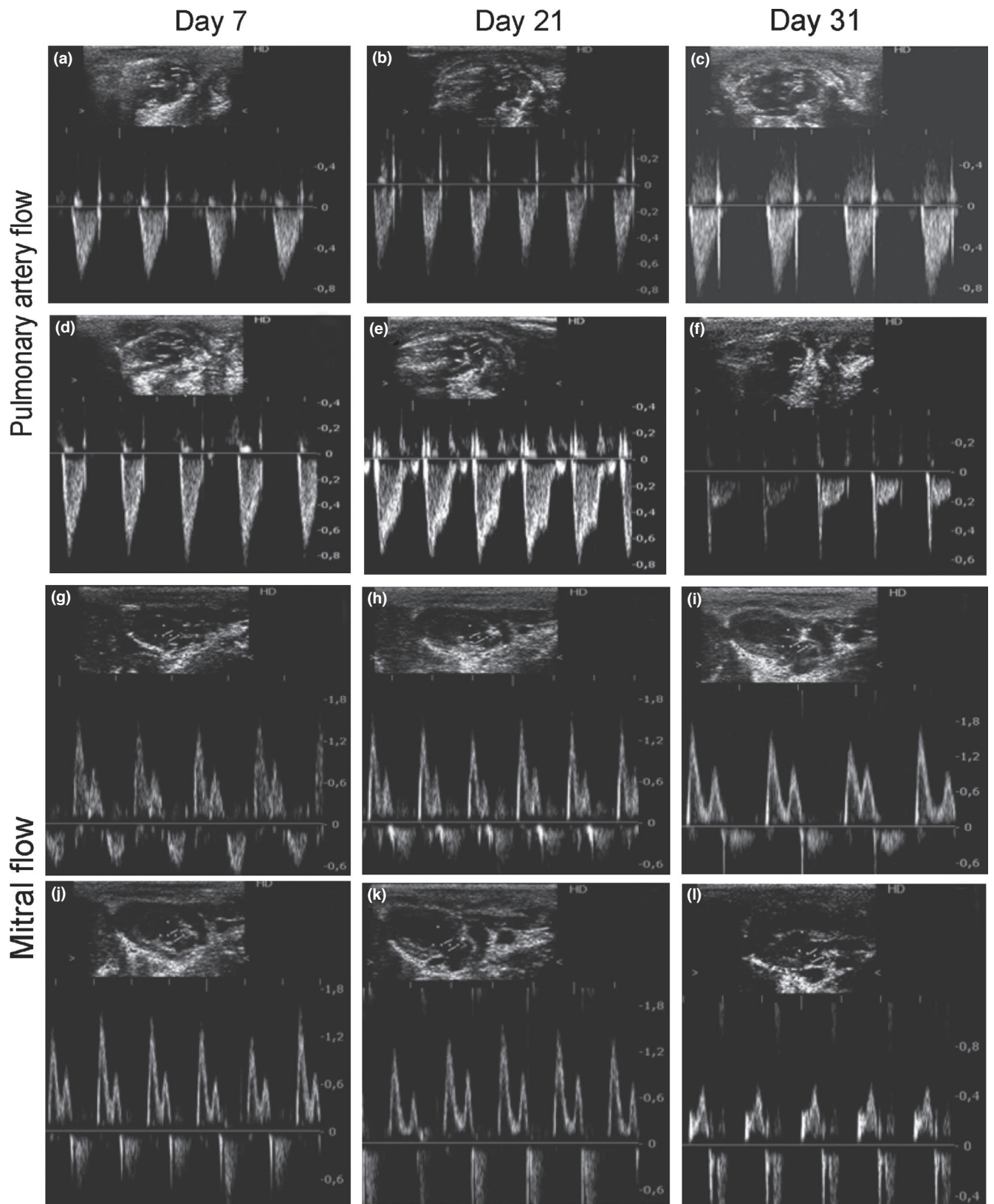
Left ventricle hydrogen peroxide concentration showed an increase ( $P < 0.05$ ) in the MCT 21 day and 31 day groups with respect to their control groups (Fig. 3a), and the oxidized-to-total glutathione ratio did not differ among groups (Fig. 3b). Ascorbic acid concentration in the LV was reduced ( $P < 0.05$ ) in the MCT 31 day group when compared to its respective control (Table 3). Thioredoxin reductase activity (TrxR) in the LV was highest in the MCT 31 day group as compared with the other groups.

## DISCUSSION

The main finding of our study was the progressive increase of pulmonary vascular resistance throughout the experimental protocol, triggering right ventricle hypertrophy and culminating in systolic and diastolic left ventricular dysfunction at 31 days after MCT administration. At this time point, an increased effort of the myocardium associated with adaptations of the intracellular antioxidant system in the left ventricle was seen.

The experimental model applied in the present study has been largely used for the development of pulmonary hypertension, followed by pressure overload to the right ventricle, hypertrophy and eventually congestive heart failure in rats.<sup>21,22</sup> Studies conducted by our group showed that cardiac hypertrophy after 21 days of the MCT injection were associated with changes in the activity of antioxidant enzymes in the right ventricle and lung.<sup>6,23</sup> Thus, we proposed to evaluate the changes generated by the development of pulmonary hypertension at distinct moments (7, 21 and 31 days) to follow the evolution of the RV hypertrophy and failure. These three moments were chosen based on studies, in this experimental model, that do not show cardiac hypertrophy after 7 days,<sup>11</sup> exhibit hypertrophic adaptation<sup>6</sup> at 21 days and show signs of heart failure at 28 days.<sup>24</sup> In our study, these data were corroborated since there was RV hypertrophy from the 21st day after MCT injection. An indicator of an increase in pulmonary vascular resistance (PVR) is the ratio of the acceleration time (AT) to the ejection time (ET). A strong negative correlation was observed between the AT/ET ratio and right ventricular hypertrophy, and a positive correlation with lung congestion was observed, strengthening the association between increased PVR, RV hypertrophy and heart failure.

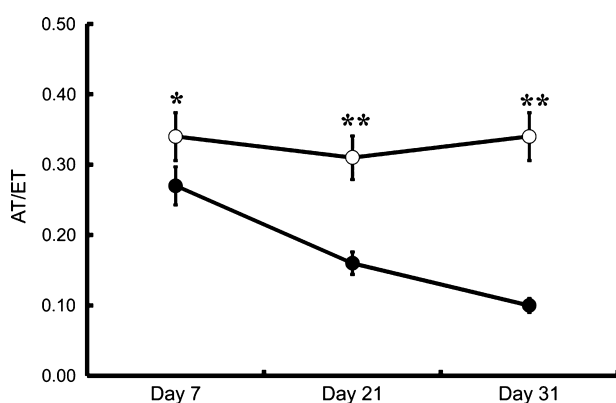




**Fig. 1** Representative echocardiograms of pulmonary artery flow (in cm/s) in control 7, 21, 31 days (a–c) and monocrotaline groups (d–f); mitral flow (in cm/s), peak E and A waves, in control groups 7, 21, 31 days (g–i) and monocrotaline groups (j–l).

The AT/ET ratio was reduced in the MCT groups (Fig. 2) from the first week of treatment. This change of flow was also observed by Kato *et al.*<sup>24</sup> in the same model 28 days after MCT administration. These findings indicate increased resistance in pulmonary circulation.<sup>25</sup> As a result of the increased PVR, the blood flow through the pulmonary artery demonstrated an evident change in its classic pattern (Fig. 1a–f) in the MCT groups from day 21, being more marked at the end of the protocol (day 31). The wave pattern found in this study is characterized as late systolic notch<sup>26</sup> and differs from a study conducted by Jones,<sup>27</sup> which showed a characteristic pattern of midsystolic notch 42 days after MCT administration. We attribute this difference in results to the fact that this model is time-dependent, and midsystolic notch denotes a higher degree of PVR.<sup>28</sup>

Although the MCT model is known to induce right ventricular dysfunction in a time- and dose-dependent fashion, significant changes were observed in left ventricle systolic and diastolic function. The performance myocardial index (PMI) has been used as a parameter of cardiac effort in both clinical studies and in experimental animals.<sup>29,30</sup> A significant increase was found in the PMI (132%,



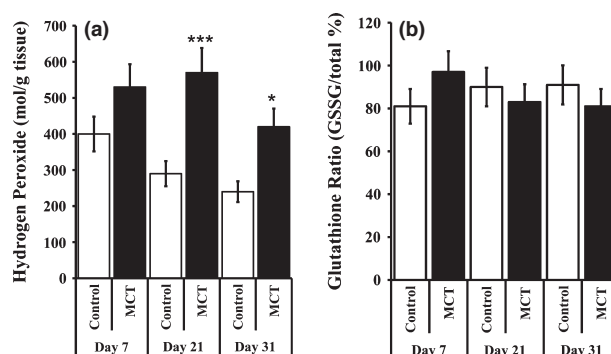
**Fig. 2** Acceleration-to-ejection time ratio (AT/ET) through the pulmonary artery. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  compared with the respective control groups. Two-way analysis of variance with post hoc Tukey test. —○—, control; —●—, monocrotaline. The data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

**Table 2** Echocardiography parameters evaluated 7, 21 and 31 days after monocrotaline (MCT) or saline (control) injections

	Day 7		Day 21		Day 31	
	Control	MCT	Control	MCT	Control	MCT
MPI	0.25 $\pm$ 0.03	0.32 $\pm$ 0.05	0.30 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.04	0.27 $\pm$ 0.03	0.65 $\pm$ 0.01***
Peak E	1.50 $\pm$ 0.03	1.40 $\pm$ 0.04	1.50 $\pm$ 0.07	1.40 $\pm$ 0.03	1.51 $\pm$ 0.07	0.80 $\pm$ 0.09***
Peak A	0.80 $\pm$ 0.04	0.70 $\pm$ 0.05	0.80 $\pm$ 0.04	0.80 $\pm$ 0.03	0.98 $\pm$ 0.05	0.60 $\pm$ 0.07**
LVSD	0.32 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.02	0.30 $\pm$ 0.02	0.28 $\pm$ 0.01	0.33 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.02***
LVDD	0.70 $\pm$ 0.01	0.70 $\pm$ 0.01	0.60 $\pm$ 0.02	0.60 $\pm$ 0.01	0.73 $\pm$ 0.01	0.50 $\pm$ 0.02***
EDPWT	0.13 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01*
ESPWP	0.22 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.01	0.24 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.01
FAC	0.70 $\pm$ 0.02	0.70 $\pm$ 0.02	0.80 $\pm$ 0.01	0.80 $\pm$ 0.02	0.52 $\pm$ 0.03	0.80 $\pm$ 0.07***
LVFS	54.00 $\pm$ 1.44	49.00 $\pm$ 2.48	56.00 $\pm$ 1.84	57.00 $\pm$ 1.86	53.00 $\pm$ 1.77	68.00 $\pm$ 5.13***

Values are means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). \*Control compared with MCT,  $P < 0.05$ ; \*\*Control compared with MCT,  $P < 0.01$ ; \*\*\*Control compared with MCT,  $P < 0.001$ . Two-way analysis of variance with post hoc Tukey test. EDPWP, End diastolic posterior wall thickness (cm); ESPWP, End systolic posterior wall thickness (cm); FAC, Fractional area change; LVDD, Left ventricle diastolic diameter (cm); LVFS, Left Ventricle Fraction Shortening (%); LVSD, Left ventricle systolic diameter (cm); MPI, Myocardial performance index.

$P < 0.001$ ) in the MCT 31 day group compared to the control 31 day group. A strong positive correlation between RV hypertrophy and the PMI ( $r = 0.75$ ,  $P < 0.001$ ) was observed, suggesting that



**Fig. 3** The data are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Hydrogen peroxide concentration in the left ventricle (a); reduced-to-total glutathione ratio in the left ventricle (b). \* $P < 0.05$  compared to the controls and \*\* $P < 0.01$  compared with the control, respectively. Two-way analysis of variance with post hoc Tukey test.

**Table 3** Antioxidants results in left ventricle of the distinct groups

	Ascorbic acid ( $\mu\text{mol/L}$ )	Tioredoxin red. (nmol/mg prot)
Day 7		
Control	23.92 $\pm$ 6.02 (5)	0.11 $\pm$ 0.05 (5)
MCT	35.27 $\pm$ 5.10 (5)	0.10 $\pm$ 0.04 (6)
Day 21		
Control	21.75 $\pm$ 5.54 (4)	0.13 $\pm$ 0.03 (6)
MCT	25.69 $\pm$ 4.60 (4)	0.13 $\pm$ 0.02 (6)
Day 31		
Control	29.47 $\pm$ 4.88 (5)	0.14 $\pm$ 0.04 (6)
MCT	9.58 $\pm$ 3.17* (4)	0.21 $\pm$ 0.05* (6)

Values are means  $\pm$  standard error of the mean (SEM) ( $n$ ). \*Compared with all groups,  $P < 0.05$ . MCT, monocrotaline. Two-way analysis of variance with post hoc Tukey test.

hypertrophy is related to the increase in resistance promoted by PAH and consequent increase of the RV workload,<sup>31</sup> influencing the LV mechanics.

Bogaard *et al.*<sup>32</sup> relate the increase in the RV afterload, due to pulmonary hypertension, to a possible reversal of the interventricular septum toward the LV, resulting in a reduction of the left ventricular chamber. Our results related to systolic function present a reduction of the LV end systolic and diastolic diameters; however, the increase of the shortening fraction (LVFS) and consequent increase in the fractional area change (FAC) (Table 2) suggest an adaptation in the attempt to preserve the stroke volume.

In the analysis of diastolic function, the values of the peak E and A waves presented differences (Table 2). The E and A waves are dependent on venous return caused by the relation between RV stroke volume and pulmonary resistance and the capacity of the left atrium to maintain its pump function, respectively. By correlating the index of hypertrophy of the RV with the E wave, a significant difference was found ( $P < 0.05$ ) with a strong negative correlation ( $r = -0.75$ ). These data suggest that the higher the RV hypertrophy, the lesser blood flows through the mitral valve during rapid filling. These data are suggestive that both systolic and diastolic LV functions are being determined by the degree of severity of the PVR.

The process of RV hypertrophy and failure has been largely related to ROS and oxidative stress.<sup>7,11,23</sup> A study conducted by Sam *et al.*<sup>33</sup> demonstrated an increase of ROS production associated with changes in the activity of antioxidant enzymes in the myocardium of patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. Previously, Pichardo *et al.*<sup>7</sup> showed an increase in lipid peroxidation and reduction of non-enzymatic antioxidant defences such as  $\alpha$ -tocopherol, but with no change of the enzymatic defences in the hypertrophied RV. Our study shows a clear increase in the concentration of hydrogen peroxide in the LV at 21 and 31 days after administration of MCT, at which point major changes are seen in RV function. Studies conducted by our group using other experimental models show hydrogen peroxide as a ROS having a flag potential for adjustments related to hypertrophy and/or cell death depending on its intracellular concentration.<sup>34,35</sup>

There are many antioxidants that may influence the hypertrophic adaptive response by means of their ability of controlling ROS concentrations. Ahsan<sup>36</sup> describes thioredoxin (TRX) and glutaredoxin (GRX) as the two main antioxidant systems involved in redox regulation to protect cells from oxidative stress by being involved in the reduction process of hydrogen peroxide to water. A significant increase was observed ( $P < 0.05$ ) in the activity of thioredoxin reductase (TrxR) in the MCT 31 day group in relation to its control. TrxR is an important enzyme that has been related to cardiac dysfunction<sup>37</sup> and has an important role in the regeneration of TRX. In this study, the increased activity of TrxR at 31 days may result from the sustained high concentrations of hydrogen peroxide in the LV as well the reduction in ascorbic acid in this time. Ascorbic acid acts as an intracellular hydrosoluble non-enzymatic antioxidant by its ability to donate electrons<sup>38</sup> and thus contributes to the maintenance of the concentration of NADPH required for the regeneration of GSH. The decrease of ascorbic acid observed in this study may represent the consumption of this important defence for the regeneration of reduced glutathione. In these time points, the redox balance (GSSG/GSH) is kept in equilibrium, probably at the expense of ascorbic acid and possibly other antioxidants recruited to cellular

defence. It is possible that at 21 days other antioxidant defences that were not evaluated may be involved in the reduction of hydrogen peroxide.

Our findings showed that LV dysfunction followed by RV changes due to pulmonary hypertension at 31 days after injection of monocrotaline is associated with hydrogen peroxide increase and a sharp reduction in vitamin C in LV. These data support the design of further studies to understand the mechanisms involved. Therapies relieving oxidative stress in the LV in conjunction with PAH treatment might be relevant.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and the Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul (SCT-RS).

## REFERENCES

- Galiè N, Manes A, Farahani KV *et al.* Pulmonary arterial hypertension associated to connective tissue diseases. *Lupus* 2005; **14**: 713–7.
- Kögler H, Hartmann O, Leineweber K *et al.* Mechanical load-dependent regulation of gene expression in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in the rat. *Circ. Res.* 2003; **93**: 230–7.
- Slinker BK, Glantz SA. End-systolic and end-diastolic ventricular interaction. *Am. J. Physiol.* 1986; **251**: H1062–75.
- Grapsa J, O'Regan DP, Pavlopoulos H, Durighel G, Dawson D, Nihoyannopoulos P. Right ventricular remodelling in pulmonary arterial hypertension with three-dimensional echocardiography: Comparison with cardiac magnetic resonance imaging. *Eur. J. Echocardiogr.* 2010; **11**: 64–73.
- Utsunomiya H, Nakatani S, Nishihira M *et al.* Value of estimated right ventricular filling pressure in predicting cardiac events in chronic pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 2009; **22**: 1368–74.
- Ludke AR, Mosele F, Caron-Lienert R *et al.* Modulation of monocrotaline-induced cor pulmonale by grape juice. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2010; **55**: 89–95.
- Pichardo J, Palace V, Farahmand F, Singal PK. Myocardial oxidative stress changes during compensated right heart failure in rats. *Mol. Cell. Biochem.* 1999; **196**: 51–7.
- Redout EM, Wagner MJ, Zuidwijk MJ *et al.* Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. *Cardiovasc. Res.* 2007; **75**: 770–81.
- Lee YS, Byun J, Kim JA *et al.* Monocrotaline-induced pulmonary hypertension correlates with upregulation of connective tissue growth factor expression in the lung. *Exp. Mol. Med.* 2005; **37**: 27–35.
- Sharma S, Grobe AC, Wiseman DA *et al.* Lung antioxidant enzymes are regulated by development and increased pulmonary blood flow. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2007; **293**: L960–71.
- Farahmand F, Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. *Mol. Cell. Biochem.* 2004; **260**: 21–9.
- Haddad F, Doyle R, Murphy DJ, Hunt SA. Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: Pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. *Circulation* 2008; **117**: 1717–31.
- Voelkel NF, Quaife RA, Leinwand LA *et al.* Right ventricular function and failure: Report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. *Circulation* 2006; **114**: 1883–91.

14. Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 40-epiadriamycin in mice. *Tumori* 1985; **71**: 241–9.
15. Tavares AM, da Rosa Araújo AS, Baldo G *et al.* Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction. *Life Sci.* 2010; **87**: 699–706.
16. Akerboom T, Sies H. Assay of glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 1981; **77**: 373–82.
17. Kyaw A. A simple colorimetric method for ascorbic acid determination in blood plasma. *Clin. Chim. Acta.* 1978; **86**: 153–7.
18. Holmgren A, Björnstedt M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol.* 1995; **252**: 199–208.
19. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods* 1980; **38**: 161–70.
20. Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; **193**: 265–75.
21. Hardziyenka M, Campian ME, de Bruin-Bon HA, Michel MC, Tan HL. Sequence of echocardiographic changes during development of right ventricular failure in rat. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 2006; **19**: 1272–9.
22. Van Albada ME, Bartelds B, Wijnberg H *et al.* Gene expression profile in flow-associated pulmonary arterial hypertension with neointimal lesions. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2010; **298**: L483–91.
23. Souza-Rabbo MP, Silva LF, Auzani JA, Picoral M, Khaper N, Belló-Klein A. Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2008; **35**: 944–8.
24. Kato Y, Iwase M, Kanazawa H *et al.* Progressive development of pulmonary hypertension leading to right ventricular hypertrophy assessed by echocardiography in rats. *Exp. Anim.* 2003; **52**: 285–94.
25. Bossone E, Bodini BD, Mazza A, Allegra L. Pulmonary arterial hypertension: The key role of echocardiography. *Chest* 2005; **127**: 1836–43.
26. Uehara Y. An attempt to estimate the pulmonary artery pressure in dogs by means of pulsed Doppler echocardiography. *J. Vet. Med. Sci.* 1993; **55**: 307–12.
27. Jones JE, Mendes L, Rudd MA, Russo G, Loscalzo J, Zhang YY. Serial noninvasive assessment of progressive pulmonary hypertension in a rat model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002; **283**: H364–71.
28. Arkles JS, Opatowsky AR, Ojeda J *et al.* Shape of the right ventricular Doppler envelope predicts hemodynamics and right heart function in pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011; **183**: 268–76.
29. Jiang BH, Tardif JC, Sauvageau S *et al.* Beneficial effects of atorvastatin on lung structural remodeling and function in ischemic heart failure. *J. Card. Fail.* 2010; **16**: 679–88.
30. Kakouros N, Kakouros S, Lekakis J, Rizos I, Cokkinos D. Tissue Doppler imaging of the tricuspid annulus and myocardial performance index in the evaluation of right ventricular involvement in the acute and late phase of a first inferior myocardial infarction. *Echocardiography* 2011; **28**: 311–9.
31. Yeo TC, Freeman WK, Schaff HV, Orszulak TA. Mechanisms of hemolysis after mitral valve repair: Assessment by serial echocardiography. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998; **32**: 717–23.
32. Bogaard HJ, Abe K, Vonk Noordegraaf A, Voelkel NF. The right ventricle under pressure: Cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest* 2009; **135**: 794–804.
33. Sam F, Kerstetter DL, Pimental DR *et al.* Increased reactive oxygen species production and functional alterations in antioxidant enzymes in human failing myocardium. *J. Card. Fail.* 2005; **11**: 473–80.
34. Schenkel PC, Tavares AM, Fernandes RO *et al.* Redox sensitive pro-survival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats. *Mol. Cell. Biochem.* 2010; **341**: 1–8.
35. Da Rosa Araújo AS, Silva de Miranda MF, Oliveira UO *et al.* Increased resistance to hydrogen peroxide-induced cardiac contracture is associated with decreased myocardial oxidative stress in hypothyroid rats. *Cell Biochem. Funct.* 2010; **28**: 38–44.
36. Ahsan MK, Lekli I, Ray D, Yodoi J, Das DK. Redox regulation of cell survival by the thioredoxin superfamily: An implication of redox gene therapy in the heart. *Antioxid. Redox Signal.* 2009; **11**: 2741–58.
37. World CJ, Yamawaki H, Berk BC. Thioredoxin in the cardiovascular system. *J. Mol. Med.* 2006; **84**: 997–1003.
38. Karajibani M, Hashemi M, Montazerifar F, Dikshit M. Effect of vitamin E and C supplements on antioxidant defense system in cardiovascular disease patients in zahedan, southeast iran. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2010; **56**: 436–40.

## 6 DISCUSSÃO CONCLUSIVA

Este estudo se propôs a avaliar aspectos ainda pouco explorados na literatura de um modelo de HAP induzido pela droga monocrotalina (MCT). Este modelo tem sido amplamente utilizado por causar injúria endotelial da vasculatura pulmonar, levando a um remodelamento pré-capilar e produzindo HAP progressiva severa, observada clinicamente (DUMITRASCU et al., 2008). O modelo se caracteriza pelo desenvolvimento de hipertensão pulmonar, seguida de sobrecarga de pressão ao ventrículo direito, hipertrofia e eventualmente insuficiência cardíaca congestiva em ratos (HARDZIYENKA et al., 2006; VAN ALBADA et al., 2010).

Estudos anteriores, realizados por nosso grupo de pesquisa, evidenciaram hipertrofia de ventrículo direito após 21 dias da injeção de MCT, associada com alterações na atividade de enzimas antioxidantes no ventrículo direito e pulmões (SOUZA-RABBO et al., 2008; LUDKE et al., 2010). No entanto, não havia sido realizada previamente uma análise de parâmetros clássicos de estresse oxidativo em tecido pulmonar e também uma avaliação do perfil temporal da progressão da HAP, especialmente sua repercussão sobre o ventrículo esquerdo.

Assim, neste estudo nos propusemos a avaliar as alterações geradas pelo desenvolvimento da HAP em momentos distintos, relacionando os achados encontrados nos pulmões à resposta cardíaca. Para tanto, buscamos um acompanhamento temporal em dois momentos (7 e 21 dias) para averiguar as alterações pulmonares após a injeção de MCT e uma latência de mais 10 dias para verificar a repercussão da HAP sobre o ventrículo esquerdo, sendo esse, portanto, analisado em três distintos momentos (7, 21 e 31 dias).

Os principais achados de nosso estudo denotam aumento de pró-oxidantes no homogeneizado de pulmão a partir do sétimo dia após injeção de MCT seguido pelo aumento da lipoperoxidação aos 21 dias, sendo ambos concomitantes ao aumento da resistência vascular pulmonar. Também observamos maior atividade da catalase no homogeneizado de pulmão do grupo MCT 21 dias, bem como alteração histológica com aumento do espaço alveolar, redução na densidade de volume e superfície. Esses achados determinam aumento progressivo da hipertrofia do ventrículo direito, culminando com disfunção ventricular sistólica e diastólica esquerda e aumento do esforço miocárdico, associado a adaptações do sistema antioxidante no ventrículo esquerdo após 31 dias da injeção de MCT.

Diversos trabalhos apresentam o efeito da sobrecarga pressórica gerada pela HAP sobre o VD; no entanto, nossa proposta foi verificarmos suas repercussões a longo prazo no VE. Bogaard et al. (2009) relacionam o aumento da pós-carga do VD, decorrente de hipertensão pulmonar, a uma possível inversão do septo interventricular em direção ao VE, acarretando numa redução da câmara ventricular esquerda. Essa inversão septal teria condições de alterar a mecânica cardíaca, forçando a adaptação funcional da câmara ventricular esquerda sob essa situação.

Iniciamos o estudo realizando avaliações após 7 dias da injeção de MCT. Este tempo foi escolhido por ser um momento em que ainda não há alterações descritas na literatura em termos de remodelamento estrutural e funcional do VD, mas já aparece o aumento da resistência pulmonar.

Estudo realizado por Wilson et al. (1989) demonstrou aumento relativo da camada média de arteríolas pulmonares 4 horas após a injeção de MCT e

presença de células inflamatórias mononucleares na adventícia dos vasos arteriais intra-acinares após 8-16 horas, indicando uma reação pulmonar inflamatória precoce nesse modelo experimental. Aos sete dias após a injeção de MCT, observamos o aumento da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e da concentração de radical ânion superóxido, verificado pela técnica de *nitroblue tetrazolium* (NBT) no homogeneizado de pulmão.

A MPO é uma enzima que catalisa a oxidação de substâncias na presença de peróxido de hidrogênio e do radical superóxido, sendo descrita como um marcador de reação inflamatória e estresse oxidativo nos pulmões (VAN et al., 2000). Tradicionalmente, o aumento da atividade da MPO tem sido associado à elevação da concentração de  $H_2O_2$  e a um papel pró-oxidante intracelular levando a injúrias oxidativas em diversos tecidos, contribuindo inclusive para disfunções pulmonares (HEINECKE, 1997; VAN et al., 2000). Utilizamos, também, a medida do NBT para avaliar a produção de ERO no tecido, em especial a presença do radical superóxido, sendo este a primeira ERO a se formar na redução monoeletrônica do oxigênio, estando envolvido no processo inflamatório (CHOI et al., 2006). Assim, nossos resultados sugerem que, já aos 7 dias após a administração de MCT, há um aumento significativo na produção de ERO. No homogeneizado de pulmão encontramos, também, aumento na concentração de proteínas nos grupos MCT, tendo correlação significativa ( $r=0.97$ ;  $P<0.01$ ) com a atividade da MPO. Estudos prévios têm associado o aumento da concentração de proteínas a situações inflamatórias e de lesão celular no tecido pulmonar (NAGATO et al., 2009; FONSECA et al., 2011). Este conjunto de resultados é indicativo de reação inflamatória no pulmão após injeção de MCT, resultando em remodelamento vascular.

Os resultados de MPO e NBT encontrados em nosso trabalho, aos sete dias, estão associados ao aumento da peroxidação lipídica encontrada nos homogeneizados de pulmão. Um dos principais efeitos das ERO é a lesão das membranas celulares pelo processo de peroxidação lipídica e protéica (HADDAD, 2002; MADGER, 2006). Consideráveis evidências apontam para um papel central dos radicais livres de oxigênio no início das doenças pulmonares (LI et al., 2010; REDOUT et al., 2010). Este processo de doença pode ser desencadeado diretamente por estas espécies, induzindo lesão celular direta ou ser consequência da ativação do processo inflamatório, mediado por fatores quimiotáticos, fatores de crescimento, enzimas proteolíticas e fatores de transcrição (VALLYATHAN; SHI, 1997). Nesse contexto as ERO, tais como o peróxido de hidrogênio, são a maior causa de dano celular e tecidual, incluindo a apoptose, associada com várias doenças inflamatórias crônicas (RAHMAN; MACNEE, 2000).

Esses dados bioquímicos indicam maior atividade pró-oxidante e estão de acordo com a característica histológica pulmonar encontrada em nosso estudo, aos 7 dias, compatível com processo inflamatório inicial. Associado a esses achados, observamos, por ecocardiografia, aumento no tempo de ejeção de sangue pela artéria pulmonar, um indício do processo inicial de aumento da resistência vascular pulmonar. Farahmand et al. (2003), também aos 7 dias após administração de mesma dose de MCT, encontraram discreto aumento da pressão ventricular direita, no entanto sem sinais de congestão pulmonar nem alteração no estado redox celular.

Na análise da função ventricular esquerda não observamos nenhuma alteração aos sete dias após MCT, sendo esse um resultado esperado, visto



que estudo realizado com mesmo modelo também não observou alteração funcional do VE após 14 dias de MCT (DAICHO et al., 2009).

Em humanos, o aumento progressivo da resistência pulmonar leva à disfunção cardíaca, inicialmente percebida pela congestão pulmonar (KURZYNA et al., 2007), dado que verificamos em nosso estudo tanto na histologia como pelo índice de congestão pulmonar, a partir do dia 21 após a injeção de MCT.

Aos 21 dias após a injeção de MCT, observamos maior atividade da catalase no homogeneizado de pulmão, sugerindo que concentrações mais elevadas de peróxido de hidrogênio estão presentes (ZMIJEWSKI et al., 2009). Esta resposta aponta para um processo adaptativo gradual do sistema antioxidante à progressão da HAP. Estudo prévio realizado por nosso grupo (LUDKE et al., 2010) apresenta expressiva redução na luz arteriolar pulmonar após 21 dias da injeção de MCT, estando associado à redução da expressão protéica da eNOS em homogeneizado de pulmão e da expressão de NADPH diaforase na parede das arteríolas pulmonares. Esta última enzima é considerada um marcador da produção de óxido nítrico (VALTSCHANOFF et al., 1992), o que sugere, portanto, que esta espécie está reduzida neste modelo de HAP. A HAP tem sido associada à disfunção endotelial e estresse oxidativo mediado por ERO (CSISZAR et al., 2009). O aumento na produção de ERO, como o radical superóxido, pode estar contribuindo para a redução da biodisponibilidade do óxido nítrico no tecido pulmonar (BOULDEN et al., 2006). Esse dado concorda com nosso estudo, visto que, aos 21 dias após a injeção de MCT, observamos aumento na concentração de superóxido verificado pela reação de NBT. O radical superóxido tem sido diretamente relacionado com

alteração do tônus vascular arterial e aumento da resistência vascular pulmonar (RHOADES et al., 1990), bem como mediador de injúria endotelial e vasoconstrição da artéria aorta (LAWSON et al., 1990) e pulmonar (JIN et al., 1991), desempenhando um aumento adicional a resistência vascular pulmonar e trabalho cardíaco.

Neste mesmo tempo, na análise estereológica, foi encontrada redução da densidade de volume e superfície, associada ao aumento do espaço alveolar, apresentando também espessamento septal, sugestivos de congestão pulmonar. Outro dado observado na histologia pulmonar foi a crescente presença de células inflamatórias, bem como eritrócitos, nos grupos MCT, sugestivo de reação inflamatória progressiva, claramente observado pela condição dos septos inter-alveolares.

Outros trabalhos da literatura (PICHARDO et al., 1999; FARAHMAND et al., 2003; OKADA et al., 2009) exploraram a resposta oxidativa e funcional do ventrículo direito (VD) em importantes janelas temporais, sendo observado que, aos 14 dias após injeção de MCT, há um aumento significativo na atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GSHPx) coincidindo com o aumento da sobrecarga do VD. Neste tempo, não foi demonstrado aumento da peroxidação lipídica em homogeneizados de VD. Após 21 dias, no entanto, há relato de que a atividade enzimática antioxidante retorna aos níveis controles, sendo observado, nesse mesmo momento, aumento da peroxidação lipídica e aumento de fibrose, o que poderia contribuir para a disfunção do VD (FARAHMAND et al., 2003; OKADA et al., 2009). O processo de hipertrofia e insuficiência do VD tem sido amplamente relacionado às ERO e estresse oxidativo (PICHARDO, 1999; FARAHMAND, 2004; SOUZA-RABBO, 2008). Por

outro lado, pouco é sabido a respeito deste fenômeno no VE, em resposta às alterações produzidas no VD. Uma vez que a literatura apresenta farta documentação de que o dano oxidativo aos tecidos, neste modelo de HAP, se dá mais precocemente do que 31 dias (CSISZAR et al., 2009; WANG et al., 2011), neste tempo não foram estudados parâmetros clássicos de estresse oxidativo, tais como, peroxidação lipídica e atividade de enzimas antioxidantes. Enzimas como SOD, CAT e GSHPx são consideradas defesas antioxidantes primárias, sendo chamadas de antioxidantes preventivos. Numa fase tardia como 31 dias, estas enzimas não teriam um papel primordial, tendo em vista que o dano oxidativo já estaria instalado. De fato, estudo de Farahmand et al. (2004) demonstrou que, após 6 semanas da administração de MCT, as enzimas antioxidantes permaneceram com atividade baixa. No entanto, tal estudo não explorou antioxidantes não-enzimáticos neste tempo tardio.

Nosso estudo apresenta um claro aumento na concentração de peróxido de hidrogênio no VE, aos 21 e 31 dias após a administração de MCT. O aumento na concentração de ERO, como já citado anteriormente, pode contribuir para a elevação do dano oxidativo. Estudo de Pichardo et al. (1999) demonstrou um aumento de 150% na peroxidação lipídica em homogeneizado de VD aos 21 dias após a administração de MCT, associado com importante decréscimo na concentração de vitamina E neste tecido. Aos 21 dias, não observamos mudanças nos parâmetros antioxidantes avaliados no VE, apesar do aumento no peróxido de hidrogênio. É possível que outros antioxidantes possam ser mais relevantes neste tempo, para evitar que o desbalanço redox se instale (como visto pela inalterada razão GSSG/GSH). Já aos 31 dias após a administração de MCT, nosso estudo mostrou redução na concentração de vitamina C (ácido ascórbico) no VE. Para evitar a propagação das reações em

cadeia, os tecidos gastam antioxidantes não-enzimáticos, tais como a vitamina C, necessária para a regeneração da vitamina E (KARAJIBANI et al., 2010). O ácido ascórbico age como um antioxidante não-enzimático intracelular pela sua capacidade de doar elétrons (KARAJIBANI, 2010), podendo assim contribuir para manter as concentrações de NADPH necessárias para regeneração de GSH. A diminuição do ácido ascórbico, observada neste estudo, poderia representar o consumo desta importante defesa para a regeneração de glutathiona reduzida. No presente estudo, o balanço redox (GSSG/GSH) está mantido em equilíbrio neste tempo no VE, provavelmente às custas destes e possivelmente de outros antioxidantes recrutados para defesa celular.

Aos 31 dias, mostrou-se um aumento da atividade da enzima tioredoxina redutase (TrxR) no grupo MCT 31 em relação ao seu controle. A TrxR é uma enzima que tem papel importante na regeneração da forma reduzida da tioredoxina (Trx), uma proteína de baixo peso molecular que atua na oxiredução intracelular. Ahsan et al. (2009) descrevem a Trx, juntamente com a peroxirredoxina (Prx), como um dos principais sistemas antioxidantes envolvidos na redução do peróxido de hidrogênio à água. A aumentada atividade da TrxR leva ao aumento nos níveis de Trx reduzida, a qual participa da reciclagem de proteínas sulfuradas. Isto pode estar contribuindo para a preservação dos níveis de GSH observada neste estudo.

Estudos realizados por nosso grupo, em outros modelos experimentais, têm apresentado o peróxido de hidrogênio como uma ERO tendo um potencial sinalizador para adaptações relacionadas à hipertrofia e/ou morte celular dependendo de sua concentração intracelular (SCHENKEL et al., 2010; DA ROSA ARAUJO et al., 2010). Assim, as variações nas ERO, resultantes da

modulação exercida pelos antioxidantes celulares, podem contribuir para o remodelamento das câmaras cardíacas de maneira benéfica (hipertrofia compensatória) ou adversa (insuficiência cardíaca) (AFANAS'EV, 2011).

Neste estudo, mostrou-se hipertrofia compensatória aos 21 dias e aos 31 dias os achados são sugestivos de insuficiência cardíaca congestiva. A partir dos 21 dias após a injeção de MCT, houve aumento no peso do VD, seguido de aumento do índice de hipertrofia cardíaca, mas sem diferença estatística no peso do VE, indicativo de que a hipertrofia cardíaca tem como causa básica a hipertrofia do VD. Usualmente, o mais importante sinal clínico de RVP é a razão do tempo de aceleração do fluxo (AT) pelo tempo de ejeção (ET) do sangue através da artéria pulmonar (BOSSONE et al., 2005). Em nosso estudo, observamos uma significativa correlação inversa entre a hipertrofia do ventrículo direito e a razão AT/ET e uma correlação direta com a congestão pulmonar, reforçando a relação entre aumento da RVP e disfunção cardíaca. A razão AT/ET, característica de aumento da RVP, foi adicionalmente diminuída no grupo MCT do dia 21 para 31, esboçando padrão compatível com o apresentado na literatura quando relacionado à HAP (UEHARA, 1993; ARKLES et al., 2011).

Apesar do modelo de MCT induzir disfunção do ventrículo direito tempo e dose dependentes, observamos importantes alterações na função sistólica e diastólica do VE aos 31 dias após a administração de MCT. Nossos resultados relacionados à função sistólica do VE apresentam redução do diâmetro sistólico final e do diâmetro diastólico final associado ao aumento da fração de encurtamento e conseqüente aumento na mudança de área fracional, sugerindo adaptação no intuito de preservar o débito sistólico. Esses achados

são observados após 31 dias da injeção de monocrotalina, momento em que foi percebida adaptação do sistema antioxidante pela redução significativa na concentração de ácido ascórbico e aumento da atividade da tioredoxina redutase no homogeneizado do VE. Apesar dessa resposta antioxidante, encontramos um aumento importante do PMI (132%,  $P < 0.001$ ) do grupo MCT 31d em relação ao controle 31d. O PMI, índice de performance miocárdica, tem sido usado como parâmetro de esforço cardíaco tanto em estudos clínicos como em animais (JIANG et al., 2010; KAKOUROS et al., 2011). Observamos significativa correlação positiva da hipertrofia do VD com o PMI ( $r = 0.75$ ;  $P < 0.001$ ), sugerindo que a hipertrofia está relacionada ao aumento de resistência promovido pela HAP e conseqüente aumento de trabalho do VD (YEO et al., 1998), influenciando a mecânica do VE. Tais resultados indicam um maior esforço miocárdico com conseqüente aumento de gasto energético, podendo ser um fator contribuinte para subseqüente desenvolvimento de insuficiência cardíaca.

A função diastólica foi analisada pela onda E e onda A, que representam o fluxo através da valva mitral. Estas ondas refletem, respectivamente, o enchimento rápido e o enchimento lento do VE. Nosso estudo apresentou redução progressiva do pico E com aumento concomitante do pico A. Uma vez que o enchimento ventricular depende da relação entre o débito sistólico do VD e da resistência pulmonar, bem como a capacidade do átrio esquerdo de manter sua função de bomba, é plausível supor que haja modificações nestes parâmetros neste modelo de HAP. Ao correlacionarmos o índice de hipertrofia do VD com a onda E, encontramos diferença significativa com significativa correlação inversa ( $r = -0.75$ ). Esses achados indicam que quanto maior a hipertrofia do VD, menor é o fluxo de sangue através da válvula mitral durante

o enchimento rápido, sugestivo de disfunção ventricular diastólica aos 31 dias após MCT.

## 7 CONCLUSÕES

O modelo experimental utilizado nesse estudo foi capaz de reproduzir HAP por meio da administração de MCT, verificado pelo gradual aumento da resistência arterial pulmonar segundo a análise ecocardiográfica. Esses achados culminaram com alterações histológicas pulmonares sugestivas de congestão pulmonar associada ao aumento do espaço alveolar, bem como aumento de pró-oxidantes no homogeneizado de pulmão, levando à maior peroxidação lipídica, acompanhada por aumento na atividade da CAT aos 21 dias após MCT.

Atribuímos os resultados observados no pulmão a progressiva mudança no ventrículo direito podendo contribuir, a longo prazo, para a disfunção sistólica e diastólica ventricular esquerda observada aos 31 dias após a injeção de MCT. Essas alterações do VE estão acompanhadas do aumento de peróxido de hidrogênio, redução de vitamina C e aumento da atividade da tioredoxina redutase no homogeneizado ventricular esquerdo, possivelmente possibilitando o equilíbrio no balanço redox.



## **8 PERSPECTIVAS**

O entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na progressão da hipertrofia e conseqüente insuficiência cardíaca é importante para propor novas estratégias de tratamento, tendo em vista que essa doença devastadora em suas formas mais severas não responde ao tratamento convencional, resultando em 2 a 3 anos de sobrevida após diagnóstico. Nossos resultados propiciam o desenho de estudos que investiguem os mecanismos moleculares envolvidos tanto no desenvolvimento da HAP como nas repercussões cardíacas decorrentes dessa doença. Também damos margem à experimentação de possível terapia antioxidante como uma opção a ser associada no tratamento da hipertensão arterial pulmonar.

## REFERÊNCIAS

- AEBI H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984, 105:121-126.
- AFANAS'EV I. ROS and RNS signaling in heart disorders: could antioxidant treatment be successful? *Oxid Med Cell Longev.* 2011, 2011: 293769.
- AGO T, SADOSHIMA J. Thioredoxin and ventricular remodeling. *J Mol Cell Cardiol.* 2006, 41: 762-73.
- AHSAN MK, LEKLI I, RAY D, et al. Redox regulation of cell survival by the thioredoxin superfamily: an implication of redox gene therapy in the heart. *Antioxid Redox Signal.* 2009, 11(11): 2741-58.
- AKERBOOM T., SIES H. Assay glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 1981, 77: 373-382.
- AQUILANO K, BALDELLI S, CIRIOLO MR. Glutathione is a crucial guardian of protein integrity in the brain upon nitric oxide imbalance. *Commun Integr Biol.* 2011, 4(4): 477-9.
- ARKLES JS, OPOTOWSKY AR, OJEDA J, et al. Shape of the right ventricular Doppler envelope predicts hemodynamics and right heart function in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011, 183(2): 268-76.
- BALLATORI N, KRANCE SM, NOTENBOOM S, et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem.* 2009, 390(3): 191-214.
- BAST A, HAENEN GR, DOELMAN CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med.* 1991, 30;91(3C): 2S-13S.
- BOGAARD HJ, ABE K, VONK NOORDEGRAAF A, et al. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest.* 2009, 135(3): 794-804.
- BOULDEN BM; WIDDER JD; ALLEN JC; et al. Early determinants of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced endothelial dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 2006, 1;41(5): 810-7.
- BOSSONE E, BODINI BD, MAZZA A, et al. Pulmonary arterial hypertension: the key role of echocardiography. *Chest.* 2005, 127: 1836-43.
- BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976, 72: 248-254.
- CAMARGO VM, MARTINS BDO C, JARDIM C, et al. Validation of a treadmill six-minute walk test protocol for the evaluation of patients with pulmonary arterial hypertension. *J Bras Pneumol.* 2009, 35(5): 423-30.
- CIGREMIS Y, TURKOZ Y, TUZCU M, et al. The effects of chronic exposure to ethanol and cigarette smoke on the formation of peroxynitrite, level of nitric

oxide, xanthine oxidase and myeloperoxidase activities in rat kidney. *Mol Cell Biochem.* 2006, 291: 127-138.

COHN, JN. Structural basis for heart failure. Ventricular remodeling and its pharmacological inhibition. *Circulation.* 1995, 91: 2504.

CHOI HS, KIM JW, CHA YN, et al. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J Immunoassay Immunochem.* 2006, 27(1): 31-44.

CSISZAR A, LABINSKY N, OLSON S, et al. Resveratrol Prevents Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. *Hypertension.* 2009, 54: 668-675.

CURY AF, BONILHA A, SARAIVA R, et al. Myocardial performance index in female rats with myocardial infarction: relationship with ventricular function parameters by Doppler echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 2005, 18(5): 454-60.

DA ROSA ARAUJO AS, SILVA DE MIRANDA MF, OLIVEIRA UO, et al. Increased resistance to hydrogen peroxide-induced cardiac contracture is associated with decreased myocardial oxidative stress in hypothyroid rats. *Cell Biochem Funct.* 2010, 28(1): 38-44.

DAICHO T, YAGI T, ABE Y, et al. Possible involvement of mitochondrial energy-producing ability in the development of right ventricular failure in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *J Pharmacol Sci.* 2009, 111(1): 33-43.

DEBOER RA, PINTO YM, VANVELDHUISEN DJ. The imbalance between oxygen demand and supply as a potential mechanism in the pathophysiology of heart failure: the role of microvascular growth and abnormalities. *Microcirculation.* 2003, 10: 113-26.

DEMARCO VG, WHALEY-CONNELL AT, SOWERS JR, et al. Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. *World J Cardiol.* 2010, 26;2(10): 316-324

DOMENIGHETTI G. Prognosis, screening, early detection and differentiation of arterial pulmonary hypertension. *Swiss Med Wkly.* 2007, 16;137(23-24): 331-6.

DRAPER HH; HADLEY M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990, 186: 421-431.

DUMITRASCU R; KOEBRICH S; DONY E; et al. Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury. *BMC Pulmonary Medicine.* 2008, 8: 25;1-15.

EBRAHIMIAN T, SAIRAM MR, SCHIFFRIN EL, et al. Cardiac hypertrophy is associated with altered thiorredoxin and ASK-1 signaling in a mouse model of menopause. *Am J Physiol Heart Physiol.* 2008, 295: H1481-8.

ECARNOT-LAUBRIET A, ASSEM M, POIRSON-BICHAT F, et al. Stage-dependent activation of cell cycle and apoptosis mechanisms in the right ventricle by pressure overload. *Biochim Biophys Acta*. 2002, 24,1586(3): 233-42.

ENGEL D, PESHOCK R, ARMSTONG RC, et al. Cardiac myocyte apoptosis provokes adverse cardiac remodeling in transgenic mice with targeted TNF overexpression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004, 287: H1303-H1311.

FARAHMAND F, HILL MF, SINGAL PK. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. *Mol Cell Biochem*. 2004, 260(1-2): 21-9.

FINKEL T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*. 2011, 11;194(1): 7-15.

FONSECA AS, PRESTA GA, GELLER M, et al. Low-intensity infrared laser increases plasma proteins and induces oxidative stress in vitro. *Lasers Med Sci*. 2011, Epub ahead of print.

GIORDANO JF. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and Heart failure. *J Clin Inv*. 2005, 115: 500-508.

GLOWAZ SL, MICHNIKA M, HUXTABLE RJ. Detection of a reactive pyrrole in the hepatic metabolism of the pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1992, 115:168-173.

GRIEVE DJ, BYRNE JA, CAVE AC, et al. Role of oxidative stress in cardiac remodeling after myocardial infarction. *Heart Lung Cir*. 2004, 13: 132-38.

GU L, PANDEY V, GEENEN DL, CHOWDHURY SAK, et al. Cigarette smoke-induced left ventricular remodelling is associated with activation of mitogen-activated protein kinases. *European Journal of Heart Failure*. 2008, 10: 1057-1064.

HADDAD J. Science review: Redox and oxygen-sensitive transcription factors in the regulation of oxidant-mediated lung injury: role for nuclear factor- $\kappa$ B. *Critical Care*. 2002, 6: 481-490.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4rd edition. Oxford: Oxford University Press; 2007.

HARDZIYENKA M, CAMPION ME, DE BRUIN-BON HA, et al. Sequence of echocardiographic changes during development of right ventricular failure in rat. *J Am Soc Echocardiogr*. 2006, 19(10): 1272-9.

HEINEKE J, MOLKENTIN JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Molecular Cell Biology*. 2006, 7: 589-600.

HEINECKE JW. Mechanisms of oxidative damage of low density lipoprotein in human atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 1997, 8(5): 268-74.

HILFIKER-KLEINER D, LANDMESSER U, DREXLER H. Molecular Mechanisms in Heart Failure: Focus on Cardiac Hypertrophy, Inflammation, Angiogenesis, and Apoptosis. *J Am Coll Cardiol*. 2006, 48: 56-66.

HOLMGREN A, BJÖRNSTEDT M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol*. 1995, 252: 199-208.

HOSSEIN AG, VOSWINCKEL R, REICHENBERGER F, et al. Hypoxia and non-hypoxia-related pulmonary hypertension: Established and new therapies. *Cardiovascular Research*. 2006, 72: 30-40.

JIANG BH, TARDIF JC, SAUVAGEAU S, et al. Beneficial effects of atorvastatin on lung structural remodeling and function in ischemic heart failure. *J Card Fail*. 2010, 16(8): 679-88.

JIN N, PACKER CS, RHOADES RA. Reactive oxygen-mediated contraction in pulmonary arterial smooth muscle: cellular mechanisms. *Can J Physiol Pharmacol*. 1991, 69(3): 383-8.

JONES JE, MENDES L, RUDD MA, et al. Serial noninvasive assessment of progressive pulmonary hypertension in a rat model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002, 283: H364-H371.

KAKOUROS N, KAKOUROS S, LEKAKIS J, et al. Tissue Doppler imaging of the tricuspid annulus and myocardial performance index in the evaluation of right ventricular involvement in the acute and late phase of a first inferior myocardial infarction. *Echocardiography*. 2011, 28(3): 311-9.

KAMEZAKI F, TASAKI H, YAMASHITA K, et al. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase ameliorates pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008, 177: 219-226

KARAJIBANI M, HASHEMI M, MONTAZERIFAR F, et al. Effect of vitamin e and C supplements on antioxidant defense system in cardiovascular disease patients in zahedan, southeast iran. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2010, 56(6): 436-40.

KATO Y, IWASE M, KANAZAWA H, et al. Progressive development of pulmonary hypertension leading to right ventricular hypertrophy assessed by echocardiography in rats. *Exp Anim*. 2003, 52(4): 285-94.

KAY JM, KEANE PM, SUYAMA KL, et al. Angiotensin converting enzyme activit and evoluation of pulmonary vascular disease in rats with monocrotaline pulmonary hipertension. *Torax*. 1982, 37: 88-96.

KLIPSTEIN-GROBUSCH K, GELEIJNSE JM, DEN BREEIJEN JH, et al. Dietary antioxidants and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr*. 1999, 69(2): 261-6.

KURZYNA M, DABROWSKI M, BIELECKI D, et al. Atrial septostomy in treatment of end-stage right heart failure in patients with pulmonary hypertension. *Chest*. 2007, 131(4): 977-83.

KYAW A. A simple colorimetric method for ascorbic acid determination in blood plasma. *Clin Chim Acta*. 1978, 86-153.

LAPA MS, FERREIRA EVM, JARDIM C, et al. Características clínicas dos pacientes com hipertensão pulmonar em dois centros de referência em São Paulo. *Rev assoc med bras*. 2006, 52(3): 139-43

LASKEY WK, PLAPPERT TA, SUTTON MG. Left ventricular mechanical load and contractile function in patients with chronic mitral regurgitation. *J Heart Valve Dis*. 2007, 16(3): 247-54.

LAWSON DL, MEHTA JL, NICHOLS WW, et al. Superoxide radical-mediated endothelial injury and vasoconstriction of rat thoracic aortic rings. *J Lab Clin Med*. 1990, 115(5): 541-8.

LI YJ, TAKIZAWA H, KAWADA T. Role of oxidative stresses induced by diesel exhaust particles in airway inflammation, allergy and asthma: their potential as a target of chemoprevention. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2010, 9(4): 300-5.

LIBERA DL, ZENNARO R, SANDRI M, et al. Apoptosis and atrophy in rat slow skeletal muscles in chronic heart failure. *Am J Physiol*. 1999, 277: C982-C986.

LIU Y, WANG D, RHALEB N, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase protects the heart against cardiac remodeling in mice with heart failure resulting from myocardial infarction. *J Cardiac Fail*. 2005, 11(1): 74-81.

LOWRY OH, ROSEBROUGH AL, FARR AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951, 193: 265-275.

LUDKE AR, MOSELE F, CARON-LIENERT R, et al. Modulation of monocrotaline-induced cor pulmonale by grape juice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2010; 55(1): 89-95.

MAGDER S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care*. 2006, 10: 208.

MARUYAMA H, WATANABE S, KIMURA T, et al. Granulocyte colony-stimulating factor prevents progression of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Circ J*. 2007, 71(1): 138-43.

MATHEW R, GUILLERMO AZ, HLA T, et al. Role of nitric oxide and endothelina-1 in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Cardiovascular Research*. 1995, 30: 739-746.

MAULIK N, DAS DK. Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions. *Biochim et Biophys Acta* 2008, 1780: 1368-82.

MCGOON M, GUTTERMAN D, STEEN V, et al. American College of Chest Physicians. Screening, early detection, and diagnosis of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2004, 126(1 Suppl): 14S-34S.

MEIJS MF, DE WINDT LJ, DE JONGE N, et al. Left ventricular hypertrophy: a shift in paradigm. *Curr Med Chem*. 2007, 14(2): 157-71.

MEYRICK B, REID L. Development of pulmonary arterial changes in rats fed *Crotalaria spectabilis*. *Am J Pathol*. 1979, 94: 37-50.

MIEYAL JJ, GALLOGLY MM, QANUNGO S, et al. Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal*. 2008, 10(11): 1941-88.

NAGATO A, SILVA FL, SILVA AR, et al. Hyperoxia-induced lung injury is dose dependent in Wistar rats. *Exp Lung Res*. 2009, 35(8): 713-28.

NOBRE VMT, CORREIA FR, FILHO JMB, et al. Intoxicação por crotália retusaem eqüídeos do semi-árido da Paraíba. *Pesq vet Bras*. 2004, 24(3): 132-43.

NOZAWA E, KANASHIRO RM, MURAD N et al. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2006, 39: 687-95.

NYSSÖNEN K, PARVIAINEN MT, SALONEN R, et al. Vitamin C deficiency and risk of myocardial infarction: prospective population study of men from eastern Finland. *BMJ*. 1997, 1;314(7081): 634-8.

OKADA M, HARADA T, KIKUZUKI R, et al. Effects of telmisartan on right ventricular remodeling induced by monocrotaline in rats. *J Pharmacol Sci*. 2009, 111(2): 193-200.

PAN LC, WILSON DW, LAME MW, et al. Cor pulmonale is caused by monocrotaline and dehydromonocrotaline, but not by glutathione or cysteine conjugates of dihydropyrolizine. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1993, 118: 87-97.

PEREIRA TN, WEBB RI, REILLY PE, et al. Dehydromonocrotaline generates sequence-selective N-7 guanine alkylation and heat and alkali stable multiple fragment DNA crosslinks. *Nucleic Acids Res*. 1998, 1;26(23): 5441-7.

PICHARDO J, PALACE V, FARAHMAND F, et al. Myocardial oxidative stress changes during compensated right heart failure in rats. *Mol Cell Biochem*. 1999, 196(1-2): 51-7.

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

PIMENTEL DR, AMIN JK, XIAO L, et al. Reactive Oxygen Species Mediate Amplitude-Dependent Hypertrophic and Apoptotic Responses to Mechanical Stretch in Cardiac Myocytes. *Circ Res*. 2001, 89: 453-460.

PORTO WG. Radicais livres e neurodegeneração. Entendimento fisiológico. Base para nova terapia? *Rev. Neurociências*, 2001 9(2): 70-76.

RAFACHO BP, AZEVEDO PS, POLEGATO BF, et al. Tobacco smoke induces ventricular remodeling associated with an increase in NADPH oxidase activity. *Cell Physiol Biochem*. 2011, 27(3-4): 305-12.

RAHMAN I, MACNEE W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J*. 2000, 16: 534-554.

RHOADES RA, PACKER CS, ROEPKE DA, et al. Reactive oxygen species alter contractile properties of pulmonary arterial smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol*. 1990, 68(12): 1581-9.

REDOUT EM, VAN DER TOORN A, ZUIDWIJK MJ, et al. Antioxidant treatment attenuates pulmonary arterial hypertension-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010, 298: H1038-H1047.

REZNICK AZ, PACKER L. Carbonyl Assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. 1994, 233: 357-363.

ROSEMBERG HC, RABINOVITCH M. Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol*. 1988, 255: 1484-1491.

ROSENZWIG EB, WIDLITZ AC, BARST RJ. Pulmonary arterial hypertension in children. *Pediatr Pulmonol*. 2004, 38: 2-22.

SCHENKEL PC, TAVARES AM, FERNANDES RO, et al. Redox sensitive pro-survival and pro-apoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats. *Mol Cell Biochem*. 2010, 341(1-2): 1-8.

SERDAR Z, ASLAN K, DIRICAN M, et al. Lipid and protein oxidation and antioxidant status in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Clin Biochem*. 2006, 39(8): 794-803.

SHIOJI K, KISHIMOTO C, NAKAMURA H, et al. Overexpression of thioredoxin-1 in transgenic mice attenuates adriamycin-induced cardiotoxicity. *Circulation*. 2002, 106: 1403-9.

SIES H. *Oxidative Stress, Oxidants and Antioxidants*. New York: Academic Press, 1991.

SIMONNEAU G, ROBBINS IM, BEGHETTI M, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009, 54(1Suppl): S43-54.

SINGH N, DHALLA AK, SENEVIRATNE C, et al. Oxidative stress and heart failure. *Mol Cell Biochem*. 1995, 147: 77-81.

SINGH PP, CHANDRA A, MAHDI F, et al. Reconvene and reconnect the antioxidant hypothesis in human health and disease. *Indian J Clin Biochem*. 2010, 25(3): 225-43.



SKÚLADÓTTIR GV, SHI-HUA D, BRODIE AE, et al. Effects of dietary oils and methyl ethyl ketone peroxide on in vivo lipid peroxidation and antioxidants in rat heart and liver. *Lipids*. 1994, 29(5): 351-7.

SOUZA-RABBO MP, SILVA LF, AUZANI JA, et al. Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008, 35(8): 944-8.

STADTMAN ER, LEVINE RL. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci*. 2000, 899: 191-208.

SUZUKI K, OTA H, SASAGAWA S, et al. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem*. 1983, 132: 345-352.

SWEDBERG K, ENEROTH P, KJEKSHUS J, et al. Hormones regulatory cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. *Circulation*. 1990, 82: 1730-1736.

TAPPIA PS, DENT MR, DHALLA NS. Oxidative stress and redox regulation of phospholipase D in myocardial disease. *Free Radical Biology & Medicine*. 2006, 41: 349-361.

THANNICKAL VJ, FANBURG BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000, 279(6): L1005-28.

UEHARA Y. An attempt to estimate the pulmonary artery pressure in dogs by means of pulsed Doppler echocardiography. *J Vet Med Sci*. 1993, 55(2): 307-12.

VALENCA SS, CASTRO P, PIMENTA WA, et al. Light cigarette smoke-induced emphysema and NFkappaB activation in mouse lung. *Int J Exp Pathol*. 2006, 87(5): 373-81.

VALLYATHAN V, SHI X. The Role of Oxygen Free Radicals in Occupational and Environmental Lung Diseases. *Environ Health Perspect*. 1997, 105(1): 165-177.

VALTSCHANOFF JG, WEINBERG RJ, RUSTIONI A. NADPH diaphorase in the spinal cord of rats. *J Comp Neurol*. 1992, 321: 209-222.

VAN ALBADA ME, BARTELDS B, WIJNBERG H, et al. Gene expression profile in flow-associated pulmonary arterial hypertension with neointimal lesions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010, 298(4): L483-91.

VAN DER VLIET A, NGUYEN MN, SHIGENAGA MK, et al. Myeloperoxidase and protein oxidation in cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000, 279(3): L537-46.

VESCOVO G, RAVARA B, GOBBO V, et al. L-Carnitine: a potential treatment for blocking apoptosis and preventing skeletal muscle myopathy in heart failure. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002, 283(3): C802-10.

- VLAHOVIC G, RUSSELL ML, MERCER RR, et al. Cellular and connective tissue changes in alveolar septal walls in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999, 160: 2086-2092.
- WANG Y, JING L, ZHAO XM, et al. Protective effects of hydrogen-rich saline on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in a rat model. *Respir Res*. 2011, 4: 12-26.
- WEITZENBLUM E. Chronic cor pulmonale. *Heart*. 2003, 89: 225–230.
- WILSON DW, SEGALL HJ. Changes in type II cells populations in monocrotaline toxicity. *Am J Pathol*. 1989, 136: 1293-1299.
- WILSON DW, SEGALL HJ, PAN LC, et al. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Crit Rev Toxicol*. 1992, 22(5-6): 307-25.
- WORLD CJ, YAMAWAKI H, BERK BC. Thioredoxin in the cardiovascular system. *J Mol Med*. 2006, 84(12): 997-1003.
- YAN CC, HUXTABLE RJ. Effects of monocrotaline, a pyrrolizidine alkaloid, on glutathione metabolism in the rat. *Biochemical Pharmacology*. 1996, 51: 375-379.
- YOSHIOKA J, SCHULZE PC, CUPESI M, et al. Thioredoxin-interacting protein controls cardiac hypertrophy through regulation of thioredoxin activity. *Circulation*. 2004, 109: 2581-86.
- YEO TC, FREEMAN WK, SCHAFF HV, et al. Mechanisms of hemolysis after mitral valve repair: assessment by serial echocardiography. *J Am Coll Cardiol*. 1998, 32(3): 717-23.
- ZMIJEWSKI JW, LORNE E, ZHAO X, TSURUTA Y et al. Antiinflammatory effects of hydrogen peroxide in neutrophil activation and acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009, 15;179(8): 694-704.