

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

Departamento de Fisiologia

Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

A INFLUÊNCIA DO ESTROGÊNIO NA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR:

PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO

RAFAELA SIQUEIRA

Porto Alegre

2011

A INFLUÊNCIA DO ESTROGÊNIO NA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR:  
PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO

RAFAELA SIQUEIRA

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

Orientadora: Profa. Dra. Adriane Belló-Klein

Porto Alegre

2011

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por estar sempre presente;

À minha família pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos;

À professora Adriane, por sua sabedoria e incansável dedicação, exemplo  
profissional e ético.

Ao professor Alex Sander, por todos os questionamentos respondidos, incentivo e  
repertório musical eclético.

À Tânia pelo auxílio técnico, pessoal e amizade.

À Professora Maristela, amiga e colega, a qual admiro e por ter me mostrado os  
caminhos da pesquisa e ao professor Jerri pela colaboração.

Aos meus amigos especiais Cristina, Luciana e Cristiano pela ajuda nos  
experimentos, paciência e amizade.

Aos meus colegas e amigos do laboratório, Bruno, Dhãniel, Gustavo, Konrad,  
Adriana, Amanda, Rafael, Paulo e Karina, pela amizade e excelente convívio.

A minha prima Bebel e Ricardo, pelos conselhos e apoio intelectual.

Aos colegas de turma pelo apoio e carinho.

Ao meu namorado e companheiro de todos os momentos Rafael Colombo, pela  
paciência, disponibilidade, amor e carinho.

*“Nós somos aquilo que fazemos repetidamente. Excelência, então, não é um modo de agir, mas um hábito.”*

Aristóteles

## SUMÁRIO

|   |      |
|---|------|
| LISTA DE TABELAS .....  | IV   |
| LISTA DE FIGURAS E QUADROS .....  | V    |
| ABREVIATURAS.....   | VI   |
| RESUMO.....   | VIII |
| ABSTRACT .....  | X    |
| 1 INTRODUÇÃO .....  | 13   |
| 1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR E <i>COR PULMONALE</i> .....            | 13   |
| 1.2 MONOCROTALINA COMO INDUTORA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL<br>PULMONAR ..... | 18   |
| 1.3 HIPERTROFIA CARDÍACA E INSUFICIÊNCIA CARDÍACA .....                   | 19   |
| 1.4 ESTRESSE OXIDATIVO NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA.....                     | 21   |
| 1.5 ESTROGÊNIO .....  | 23   |
| 1.6 ESTROGÊNIO, ESTRESSE OXIDATIVO E INSUFICIÊNCIA CARDÍACA.....          | 26   |
| 2 OBJETIVOS .....   | 30   |
| 2.1 OBJETIVO GERAL .....  | 30   |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 30   |
| 3 HIPÓTESE .....  | 31   |
| 4 METODOLOGIA.....  | 32   |
| 4.1 ANIMAIS .....   | 32   |
| 4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....   | 33   |
| 4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....   | 33   |
| 4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO DA OVARIECTOMIA BILATERAL.....                 | 34   |
| 4.5 DETERMINAÇÃO DO CICLO ESTRAL.....                                     | 35   |
| 4.6 REPOSIÇÃO ESTROGÊNICA .....   | 35   |
| 4.7 INDUÇÃO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR .....                        | 36   |
| 4.8 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA.....   | 36   |
| 4.9 PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS.....                                       | 37   |
| 4.10 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS .....                                     | 37   |
| 4.11 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA TOTAL E<br>REDUZIDA ..... | 38   |
| 4.12 MEDIDA DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.....                                | 38   |
| 4.13 AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES .....                            | 39   |
| 4.13.1 <i>Superóxido dismutase (SOD)</i> .....                            | 39   |
| 4.13.2 <i>Catalase</i> .....  | 40   |
| 4.13.3 <i>Glutaciona peroxidase (GPx)</i> .....                           | 40   |
| 4.14 QUIMILUMINESCÊNCIA (QL) .....  | 41   |
| 4.15 EXPRESSÃO PROTÉICA DO ANP POR <i>WESTERN BLOT</i> .....              | 42   |
| 4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....  | 43   |

|   |    |
|---|----|
| 5. RESULTADOS .....                             | 44 |
| 5.1 AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS ..... | 44 |
| 5.2 AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS HEMODINÂMICAS.....  | 47 |
| 5.3 AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS .....   | 48 |
| 6 DISCUSSÃO .....                               | 55 |
| CONCLUSÃO.....                                  | 62 |
| PERSPECTIVAS.....                               | 63 |
| REFERÊNCIAS.....                                | 64 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 – Medida do peso corporal antes e após 21 dias da administração de monocrotalina (60 mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, associado ou não com reposição de estrogênio .....   | 44 |
| Tabela 2 - Medidas morfométricas do coração após 21 dias da administração de monocrotalina (60 mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, associado ou não com reposição de estrogênio .....  | 45 |
| Tabela 3 - Medidas morfométricas do fígado e pulmão (congestão hepática e pulmonar), após 21 dias da administração de monocrotalina (60 mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, associado ou não com reposição de estrogênio ..... | 46 |
| Tabela 4 - Parâmetros hemodinâmicos em VD após 21 dias da administração de monocrotalina (60 mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, associado ou não com reposição de estrogênio .....  | 47 |
| Tabela 5 – Parâmetros bioquímicos após 21 dias da administração de monocrotalina (60 mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, associado ou não com reposição de estrogênio .....  | 48 |

## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Esquema do desenvolvimento do <i>Cor pulmonale</i> .....  | 16 |
| Figura 2- <i>Crotalaria spectabilis</i> .....  | 17 |
| Figura 3- Desenho experimental do estudo .....   | 33 |
| Figura 4 - Concentração da GSH total após 21 dias da administração de monocrotalina (60mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, associado ou não com reposição de estrogênio .....            | 49 |
| Figura 5 - Concentração da GSSG após 21 dias da administração de monocrotalina (60mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, associado ou não com reposição de estrogênio .....                 | 50 |
| Figura 6 - Concentração da GSH após 21 dias da administração de monocrotalina (60mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, associado ou não com reposição de estrogênio .....                  | 51 |
| Figura 7 - Razão da GSH/GSSG após 21 dias da administração de monocrotalina (60mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, associado ou não com reposição de estrogênio .....                    | 52 |
| Figura 8 - Correlação da concentração de GSH com a PDFVD após 21 dias da administração de monocrotalina (60 mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, ou não com reposição de estrogênio ..... | 53 |
| Figura 9 - Imunoconteúdo do ANP após 21 dias da administração de monocrotalina (60 mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, associado ou não com reposição de estrogênio .....                | 54 |
| Quadro 1- Classificação clínica de hipertensão pulmonar .....  | 14 |



## ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de Variância

ANP: peptídeo atrial natriurético

ATP: adenosina trifosfato

BNP: peptídeo cerebral natriurético

bpm: batimentos por minuto

CAT: catalase

DNA: ácido desoxirribonucléico

ECG: eletrocardiograma

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

ERN: espécies reativas de nitrogênio

ERO: espécies reativas de oxigênio

ER $\alpha$ : receptor de estrogênio alfa

ER $\beta$ : receptor de estrogênio beta

FC: frequência cardíaca

GPR30: receptor de estrogênio acoplado à proteína G

GPx: glutathione peroxidase

GSH: glutathione reduzida

GSSG: glutathione oxidada

HAP: hipertensão arterial pulmonar

HIV: vírus da imunodeficiência humana

HVD: hipertrofia ventricular direita

IC: insuficiência cardíaca

ICD: insuficiência cardíaca direita

ICE: insuficiência cardíaca esquerda

IHC: índice de hipertrofia cardíaca

LPO: lipoperoxidação

MAPKs: proteínas quinase mitógeno-ativadas

MCT: monocrotalina

MnSOD: superóxido dismutase manganês

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

O: ovariectomia

OM: ovariectomia + MCT

OMR: ovariectomia + MCT + reposição estrogênio

PAPm: pressão arterial pulmonar média

PDFVD: pressão diastólica final do ventrículo direito

PE-50: cateter de polietileno

PMSF: fluoreto de fenil metil sulfonil

PSVD: pressão sistólica do ventrículo direito

QL: quimiluminescência

RNA: ácido ribonucléico

S: sham

SM: sham + MCT

SOD: Superóxido dismutase

SRA: sistema renina-angiotensina

VD: ventrículo direito

## RESUMO

A hipertensão arterial pulmonar é uma síndrome caracterizada por vasoconstrição e remodelamento vascular pulmonar, levando a um aumento progressivo na resistência vascular pulmonar, que eleva a pós-carga imposta ao ventrículo direito, gerando conseqüente hipertrofia e insuficiência cardíaca direita. Essa doença acomete duas vezes mais mulheres do que homens. O estresse oxidativo está envolvido na patogênese da hipertensão arterial pulmonar. O hormônio estrogênio, comportando-se como *scavenger* de radicais livres, é capaz de modular o estresse oxidativo. O modelo experimental de hipertensão arterial pulmonar induzido por monocrotalina vem sendo utilizado por mimetizar as alterações que decorrem desta patologia em humanos. Dessa maneira, o objetivo desse estudo foi testar a hipótese de que o estrogênio poderia atenuar a hipertrofia do ventrículo direito e sua progressão para insuficiência cardíaca, modulando o estresse oxidativo, nos animais que receberam a monocrotalina. Ratas wistar fêmeas com 60 dias foram ovariectomizadas ou sofreram simulação da mesma. Após sete dias, receberam implantação de pellets subcutâneos com 17 $\beta$ -estradiol ou óleo de girassol. Neste momento, foi também administrada injeção intraperitoneal de monocrotalina ou salina. Os grupos experimentais foram: *sham* (S) - simulação da cirurgia de ovariectomia, não submetidas ao tratamento com MCT; *sham* + MCT (SM) - simulação da cirurgia de ovariectomia, e tratadas com MCT; ovariectomia (O) - cirurgia de ovariectomia, não submetidas ao tratamento com MCT; ovariectomia + MCT (OM) - cirurgia de ovariectomia, e tratadas com MCT; ovariectomia + MCT + reposição estrogênio (OMR) - cirurgia de ovariectomia, tratadas com MCT e estrogênio. As medidas hemodinâmicas foram realizadas 21 dias após a administração da monocrotalina ou salina nos animais ovariectomizados e, nos outros grupos, na fase do diestro. Foi verificada a pressão diastólica final do ventrículo direito, pressão sistólica do ventrículo direito e frequência cardíaca. Após a análise, as ratas foram mortas por deslocamento cervical e o coração, pulmão, fígado e útero foram coletados. As análises morfométricas foram realizadas após a retirada dos órgãos para avaliar hipertrofia cardíaca, congestão pulmonar e hepática. Amostras de ventrículo direito foram utilizadas para analisar a concentração de peróxido de hidrogênio, a razão da glutathiona reduzida/oxidada, lipoperoxidação e

defesas antioxidantes enzimáticas. O imunoconteúdo de ANP (peptídeo natriurético atrial) foi também avaliado em homogeneizado cardíaco. Os dados de pressão sistólica, hipertrofia cardíaca, defesa antioxidante enzimática, concentração de peróxido de hidrogênio e lipoperoxidação não mostraram diferença entre os grupos. Houve congestão pulmonar no grupo OM, sendo esta diminuída no grupo OMR. Isto sugere que o estrogênio esteja atenuando a resistência vascular pulmonar. Também houve aumento da pressão diastólica final do ventrículo direito nos grupos OM e OMR. A razão das glutations se mostrou diminuída nos grupos O, OM e OMR, assim como a glutaciona reduzida nos grupos O e OM, sugerindo a influência do estrogênio na modulação do estado redox celular. Os dados sugerem que o estrogênio possa exercer grande influência no equilíbrio redox celular, podendo este efeito contribuir para evitar o surgimento do edema pulmonar, característico deste modelo de hipertensão arterial pulmonar e insuficiência do ventrículo direito.

Palavras-chave: monocrotalina, *Cor pulmonale*, glutaciona, hipertrofia de ventrículo direito, congestão pulmonar.

## ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension is a syndrome characterized by vasoconstriction and pulmonary vascular remodeling, leading to a progressive increase in pulmonary vascular resistance, which increases the afterload imposed on the right ventricle, causing consequent hypertrophy and heart failure. This disease affects twice as many women as men. The oxidative stress is involved in pulmonary artery hypertension, as well as the estrogen hormone modulating the oxidative stress, behaving like scavenger of free radicals. The experimental model of pulmonary hypertension induced by monocrotaline has been used to mimic the changes from this pathology. Thus, the objective of this study was to test the hypothesis that estrogen could attenuate ventricular hypertrophy and its progression to heart failure, modulating oxidative stress in animals received monocrotaline. Female Wistar rats aged 60 days were ovariectomized or underwent sham same, 7 days after implantation of pellets were subcutaneous  $17\beta$ -estradiol or sunflower oil more intraperitoneal injection of monocrotaline or saline. The experimental groups (n = 9-13 per group) were: SHAM (S) – sham surgery, ovariectomy, no treated with MCT, MCT + SHAM - simulation of ovariectomy surgical and treated with MCT; OVARIECTOMY (O) – ovariectomy surgical, no treated with MCT, MCT + OVARIECTOMY (OM) – ovariectomy surgical, and treated with MCT; MCT + + OVARIECTOMY ESTROGEN REPLACEMENT (OMR) - surgery, ovariectomy, and treated with MCT estrogen. Hemodynamic measurements were performed 21 days after administration of saline or monocrotaline in ovariectomized animals and other groups in diestrus phase with anesthetized animals. The ventricular end diastolic pressure right ventricular systolic pressure and right heart rate was verified. After analyzing, the rats were killed by cervical dislocation and the heart, lung, liver and uterus were collected. Analyses morphometry were performed after withdrawal of agencies to evaluate cardiac hypertrophy, congestion lung and liver. The right ventricular mass was used to analyze the redox status (hydrogen peroxide and glutathione ratio) antioxidant enzymatic defenses and protein expression of ANP. The Data for systolic blood pressure, cardiac hypertrophy, antioxidant defense enzyme concentration hydrogen peroxide and lipid peroxidation showed no difference between the groups, which may be related with normal

distribution. There was congestion pulmonary CO group and decreased in group OMR, suggesting that estrogen is attenuating the pulmonary vascular resistance, as well as increased end-diastolic pressure in the right ventricle OMR and OM groups. The glutathione ratio was shown decreased in groups O, CO and OMR, as well as reduced glutathione in groups O and CO, suggesting the influence of estrogen on modulation of cellular redox state. The data suggest that estrogen can exert great influence on the cellular redox balance and this effect may help to avoid the appearance of pulmonary edema, a characteristic of pulmonary hypertension and right ventricular failure.

Key words: monocrotaline, *Cor pulmonale*, glutathione, right ventricle hypertrophy, lung congesti



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR E *COR PULMONALE*

A circulação pulmonar é caracterizada por um circuito de baixa pressão, com alta capacitância e baixa resistência ao fluxo sanguíneo. Quando ocorrem anormalidades nos mecanismos desta circulação, pode haver um aumento na velocidade do fluxo sanguíneo ou na resistência vascular, resultando na hipertensão arterial pulmonar (Farhat et al.), conforme a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2005).

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma síndrome patológica caracterizada por vasoconstrição e remodelamento vascular pulmonar, que leva a um aumento progressivo na resistência vascular pulmonar e a manifestações clínicas como dispnéia, fadiga, dores no peito, síncope, edema periférico e palpitações. A pressão arterial pulmonar média (PAPm) é superior ou igual a 25 mmHg em repouso ou 30 mmHg durante o esforço e a pressão capilar pulmonar normal inferior ou igual a 15 mmHg (Lehrman et al. 2002; Chan; Loscalzo 2008; Bogaard et al. 2009; Yildiz 2009). Outras características da HAP são a fibrose intimal das pequenas artérias pulmonares, a proliferação do músculo liso vascular e a oclusão arterial pulmonar (Chan; Loscalzo 2008). Estas reforçam a noção de que a HAP é uma doença vasoproliferativa, determinada por estímulos mitogênicos (Chin; Rubin 2008).

Essa doença representa um importante problema clínico que pode conduzir ao desenvolvimento da hipertrofia ventricular direita (HVD) e insuficiência cardíaca (IC) associado à elevada taxa de mortalidade (Chen et al. 2001). Pacientes com



doença cardíaca congênita, doença do tecido conjuntivo, hipertensão portal e vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresentam maior probabilidade de desenvolver HAP (Chin; Rubin 2008).

Sua etiologia não está bem definida, visto os múltiplos genes e fatores ambientais envolvidos. Nos últimos anos, o reconhecimento precoce e a expansão de novas opções de tratamento têm melhorado o prognóstico para pacientes com HAP. No entanto, a taxa de mortalidade corresponde de 20% a 40%, três anos após o diagnóstico (Bogaard et al. 2009; Yildiz 2009). Alguns agentes farmacológicos utilizados no tratamento da HAP incluem os bloqueadores dos canais de cálcio, antagonistas de endotelina e inibidores da fosfodiesterase-5. A escolha da terapia a ser prescrita geralmente é baseada na classe funcional, nos dados hemodinâmicos e na capacidade de realizar exercício físico (Chin; Rubin 2008).

O desequilíbrio da sinalização vasodilatadora endotelial é uma das várias etiologias na patogênese da HAP. Observações recentes sugerem que alguns aspectos da disfunção endotelial podem ser geneticamente condicionados, como os polimorfismos do gene que codifica a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e as alterações primárias ou secundárias nas diferentes formas de HAP (Droma et al. 2002). O endotélio atua como um sensor de estímulos lesivos, como estresse de cisalhamento, inflamação e toxinas (Chan; Loscalzo 2008). Os hormônios sexuais, principalmente o estrogênio, também desempenham um papel importante na disfunção endotelial (Bhupathy et al. 2010).

A HAP foi classificada segundo similaridades em sua patofisiologia e respostas ao tratamento, conforme mostrado no quadro 1. Sua incidência afeta com maior frequência e severidade mulheres do que homens (razão de 1,7:1), em todas as idades (Lehrman et al. 2002; Chan; Loscalzo 2008; Chin; Rubin 2008).

Entre as mulheres, a prevalência é maior na terceira década e entre os homens na quarta década de vida (Lehrman et al. 2002). A idade média do diagnóstico é relatada entre 36 a 50 anos de idade (Chin; Rubin 2008).

#### Quadro 2- Classificação clínica de hipertensão pulmonar

| Classificação clínica da hipertensão pulmonar (Dana Point, 2008)           |
|--|
| 1. Hipertensão Arterial Pulmonar   |
| 2. Hipertensão Pulmonar associada a doenças do coração esquerdo            |
| 3. Hipertensão pulmonar associada com doenças pulmonares e / ou hipoxemia. |
| 4. Hipertensão pulmonar devido à trombose crônica e / ou embólica          |
| 5. Hipertensão pulmonar com mecanismos multifatoriais não claros           |

Fonte: Adaptação de (Simonneau et al. 2009)

A análise criteriosa do eletrocardiograma (ECG) pode sugerir algumas etiologias para hipertensão arterial pulmonar como estenose mitral, cardiopatias congênitas e miocardiopatias. A dificuldade do ventrículo direito (VD) em adequar o fluxo pulmonar à demanda de oxigênio ( $O_2$ ), devido ao aumento da massa ventricular e da diminuição na pressão coronariana leva à diminuição na capacidade funcional (Droma et al. 2002; Casserly; Klinger 2009). Essa está fortemente relacionada com a fração de ejeção do VD, onde pacientes com HAP apresentam redução da fração de ejeção deste ventrículo (Droma et al. 2002). Deve-se ter em mente que a fração de ejeção do VD é o resultado da interação complexa entre a pré-carga, pós-carga e contratilidade do ventrículo (Chaouat et al. 2008).

O VD não é capaz de sustentar a sobrecarga de pressão em longo prazo, ocorrendo diminuição da força de contração, por mudanças estruturais e funcionais

dos cardiomiócitos, e conseqüente dilatação do VD. A síntese de proteínas nos cardiomiócitos é diretamente induzida pelo estiramento e aumentada por influências autócrinas, parácrinas e neuro-humorais (Bogaard et al. 2009).

Os efeitos patológicos no VD, como hipertrofia e dilatação, em decorrência da disfunção pulmonar caracterizam o quadro chamado de *Cor pulmonale*. Comumente a HAP é o elo entre as mudanças funcionais e estruturais do VD e a patologia do pulmão. Aproximadamente 20% dos casos de pacientes com IC apresentam *Cor pulmonale* (Farahmand et al. 2004; Chaouat et al. 2008).

Quanto maior a pós-carga imposta ao VD, induzida pelas alterações na resistência vascular pulmonar total, maior será a tensão desenvolvida pelo VD durante a sístole, desencadeando um mecanismo compensatório frente a essa situação. A pós-carga está aumentada em qualquer doença associada à HAP, na maioria das vezes, levando à hipertrofia cardíaca (Baruzzi et al. 1986).

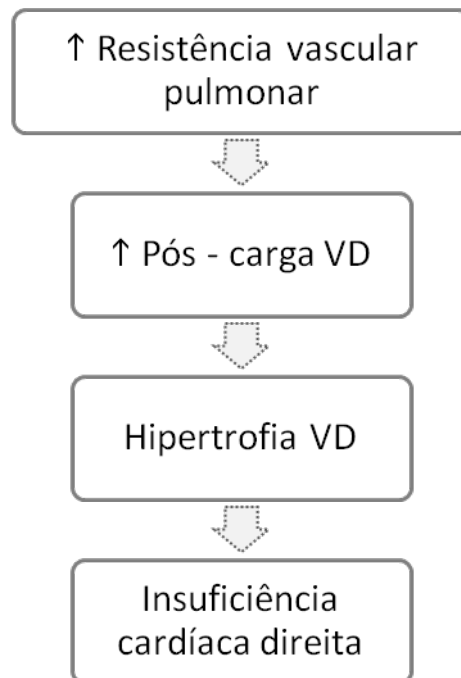


Figura 1 - Esquema do desenvolvimento do *Cor pulmonale*

Os mecanismos de transição da hipertrofia à dilatação no VD não estão bem definidos, mas sugere-se que modificações neuro-humorais, ativação do sistema imune, estresse oxidativo e nitrosativo, entre outros, modifiquem o desenvolvimento da insuficiência cardíaca direita (ICD) na HAP. O sistema neuro-humoral desempenha grande influência, frente à sobrecarga de pressão. Isto porque existe secreção de neuro-hormônios, como aldosterona e peptídeos natriuréticos localmente, por miócitos, células endoteliais e fibroblastos (Bogaard et al. 2009).

Um melhor entendimento dos mecanismos de transição da hipertrofia para a insuficiência cardíaca pode contribuir para desenvolver tratamento específico para o VD, melhorando o prognóstico e sobrevida de pacientes com HAP (Bogaard et al. 2009).

## 1.2 MONOCROTALINA COMO INDUTORA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

A monocrotalina é um alcalóide pirrolizidínico presente em uma grande quantidade de plantas, como nas sementes de *Crotalaria spectabilis*. A hepatotoxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos está associada à presença de insaturação entre os carbonos 1 e 2 que na presença de oxidases leva à formação de pirróis, que se associam a grupos nucleofílicos de macromoléculas, como sulfidril, hidroxila e grupos amino de enzimas, globulinas, hemoglobinas, bem como purinas e pirimidinas, formando ligações cruzadas irreversíveis com o ácido desoxirribonucléico (DNA) e ácido ribonucléico (RNA), acarretando efeitos citotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (Comini et al. 1996; Santos et al. 2007).



Figura 2 – Imagem da *Crotalaria spectabilis* mostrando folhas e flores

Fonte: disponível na web em:  
<httpksbookshelf.comDWFlowerFlowerKUNA.htm>

O modelo experimental de hipertensão arterial pulmonar geralmente utiliza a monocrotalina (MCT) como veículo para seu desenvolvimento. As vantagens principais da aplicabilidade são a facilidade e rapidez de reproduzir o modelo, bem como, mimetizar os sintomas da síndrome (Doggrell; Brown 1998). Os metabólitos produzidos na degradação da MCT pelo fígado, principalmente a dehidromonocrotalina, atuam na vasculatura pulmonar, causando danos às células endoteliais e levando ao desenvolvimento de alterações estruturais e funcionais, uma das características da HAP (Farhat et al. 1993).

Farahmand e colaboradores (2004) enfatizam que, em relação à toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos, deve-se levar em consideração idade, sexo e espécie animal.

No estudo de Kögler (Kögler et al. 2003), foi utilizada dose única do alcalóide MCT, causando vasculite das arteríolas pulmonares, que conduzem à hipertensão arterial pulmonar por hipertrofia ventricular direita e conseqüente desenvolvimento de IC. A pressão arterial média ficou inalterada, indicando preservação da função ventricular esquerda na presença de um realçado aumento da pressão sistólica do ventrículo direito.

### 1.3 HIPERTROFIA CARDÍACA E INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

A hipertrofia cardíaca é considerada um fenômeno de adaptação do miocárdio a sobrecargas hemodinâmicas, estando associada a quase todas as doenças do coração, propiciando maior risco de desenvolvimento IC (Franchini 2002).

Essa adaptação responde à sobrecarga de pressão imposta ao coração sob a forma de espessamento da parede e redução do tamanho da cavidade. As células do coração hipertrofiado sofrem um processo denominado de apoptose e ou necrose, associada com a proliferação de fibroblastos e à expansão da matriz extracelular (Doggrell; Brown 1998).

A estrutura do miocárdio se altera de duas formas, uma quando ocorre uma sobrecarga de volume, ou seja, um aumento da pré-carga, como no exercício físico devido ao aumento do retorno venoso, que denominamos de hipertrofia excêntrica e quando a causa se deve à sobrecarga de pressão, ou seja, um aumento da pós-carga (Magalhães et al. 2008).

Como substrato histológico, ocorre o aumento das dimensões dos miócitos cardíacos pelo aumento dos elementos estruturais, com ativação de síntese protéica. Isso não abrange todos os aspectos fenotípicos, visto que há diferentes condições fisiopatológicas como a presença de IC, fatores genéticos e mecanismos neuro-humorais, dentre outros, que acompanham a hipertrofia (Franchini 2002).

Os peptídeos natriuréticos desempenham um importante papel nas respostas hipertróficas nos cardiomiócitos. Estudos observaram que a hipertrofia cardíaca, em decorrência do aumento sustentado da pós-carga ventricular, está relacionada a um aumento significativo do peptídeo atrial natriurético (ANP) ventricular e da expressão do mRNA do peptídeo cerebral natriurético (BNP) (Casserly; Klinger 2009).

Chen et al (2001) observaram que ratos com hipertrofia ventricular direita induzida por MCT (injeção subcutânea - 60 mg/kg), após vinte e um dias, mostraram a presença focal de necrose dos miócitos e infiltração mononuclear de leucócitos com adiantada fibrose. Ratos machos tratados com MCT e observados 6 semanas

após, apresentaram congestão pulmonar e hepática, diminuição da atividade das enzimas antioxidantes e aumento da lipoperoxidação (Farahmand et al. 2004).

A insuficiência cardíaca é um problema clínico, com altos índices de morbidade e mortalidade em países desenvolvidos, sendo um problema crescente para a saúde pública (Babiker et al. 2002).

A insuficiência cardíaca direita geralmente é decorrente da insuficiência cardíaca esquerda (Rossouw et al. 2007), mas pode ocorrer de forma primária, sendo frequentemente acompanhada de hipertensão arterial pulmonar crônica (Farahmand et al. 2004). Com essas disfunções pulmonares há uma maior pós-carga do ventrículo direito, determinada pela hipertensão pulmonar ou resistência vascular pulmonar, e maior será a força que o VD deverá manter durante a sístole, acarretando em hipertrofia (Baruzzi et al. 1986; Piao et al. 2010).

A maioria dos pacientes com IC, independentemente da etiologia, desenvolvem um componente de insuficiência do VD. Aproximadamente 14 a 34% dos casos de insuficiência cardíaca são atribuídos ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca direita, sendo que, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão bem elucidados (Pichardo et al. 1999; Piao et al. 2010).

A resposta da hipertrofia ventricular é mediada provavelmente, em grande parte, pela produção parácrina e autócrina de agentes hipertróficos ligados à sinalização celular (Chen et al. 2001).

#### 1.4 ESTRESSE OXIDATIVO NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

O estresse oxidativo é um contribuinte potencial para a insuficiência cardíaca. O termo estresse oxidativo representa uma situação onde, a produção das espécies



reativas de oxigênio seja superior à capacidade do organismo de neutralizar os efeitos dessas moléculas, através das defesas antioxidantes dos tecidos. Os radicais livres e as ERO causam modificações nos lipídios, proteínas e DNA, alterando sua conformação e funções (Halliwell 1999; Llesuy 2002; Tsutsui et al. 2009).

O equilíbrio entre a geração das ERO e sua neutralização é mantido por vários mecanismos interligados e complexos, e uma disfunção de qualquer um destes por estímulos endógenos ou exógenos, pode levar à alteração na sinalização redox, aumentando os níveis intracelulares de ERO e conseqüente estresse oxidativo (Trachootham et al. 2008; Tsutsui et al. 2009).

Em condições fisiológicas, a reatividade moderada das ERO e espécies reativas de nitrogênio permite sua incorporação na estrutura de macromoléculas de maneira reversível, agindo como moléculas sinalizadoras, desempenhando um papel fundamental na regulação da função celular, promovendo proliferação e sobrevivência celular. Entretanto, sob estresse oxidativo, o excesso das ERO e ERN pode gerar danos graves e irreversíveis a lipídeos, proteínas e DNA (Trachootham et al. 2008).

As reservas antioxidantes podem estar reduzidas na IC em conseqüência da superprodução das ERO. Em grande parte dos tecidos, essas reservas se baseiam em enzimas antioxidantes, dentre as principais a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase (Valko et al. 2007; Tsutsui et al. 2009).

As ERO danificam a função contrátil do coração, dificultando a habilidade dos miócitos em gerar adenosina trifosfato (ATP), como também em processos de sinalização intracelular, que podem desencadear hipertrofia cardíaca, apoptose e necrose celular, assim como dano endotelial significativo (Maccarthy; Shah 2003).

Estudos apontam que o estresse oxidativo tem papel importante na diferenciação, crescimento e apoptose celular, através da ativação de proteínas quinase mitógeno-ativadas (MAPKs), assim como na regulação da expressão de vários genes e fatores de transcrição envolvidos no remodelamento vascular (Giordano 2005). No coração, a ativação da MAPK p38 foi observada em situação de sobrecarga de pressão e hipertrofia induzida por infarto do miocárdio, tanto em modelos animais quanto em humanos (Liu et al. 2005). See e colaboradores (See et al. 2004) sugerem que a inibição da MAPK p38 pode ser uma perspectiva de terapia no tratamento da disfunção do miócito cardíaco, observada na insuficiência cardíaca.

O estresse oxidativo não está envolvido somente na IC, mas em várias doenças cardiovasculares, como na HAP. Um entendimento mais abrangente das vias de sinalização redox e dos mecanismos de ação dos pró-oxidantes e antioxidantes são importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas na prevenção destas doenças (Trachootham et al. 2008).

Conforme visto anteriormente, o quadro de HAP e *Cor pulmonale* e suas *consequentes alterações*, é predominante em mulheres, portanto, será analisada a participação do hormônio sexual estrogênio frente a estas patologias.

## 1.5 ESTROGÊNIO

O estrogênio é um hormônio esteróide sexual que regula o crescimento, desenvolvimento e função do sistema reprodutivo feminino. Também há evidência substancial para um efeito do estrogênio sobre o sistema cardiovascular (Nascimento et al. 2009).

Os estrogênios naturais (estradiol, estrona e estriol) são moléculas lipofílicas, que têm sua biossíntese através da conversão da testosterona pela ação da enzima aromatase, são transportados no plasma ligados à albumina e a globulinas, atingem seus tecidos alvos e liberam-se das proteínas transportadoras, penetrando por difusão simples ou facilitada no citosol e se acoplam aos seus receptores específicos nucleares ou não nucleares (Gruber et al. 2002; Miller; Duckles 2008).

No núcleo, o complexo hormônio-receptor liga-se a sítios específicos da cromatina, estimulando a síntese de vários mRNAs; após deslocam-se para o citosol, ao nível dos ribossomos, desencadeando síntese protéica (Levin 2002; Smiley; Khalil 2009).

Os receptores estrogênicos específicos têm sido identificados em vários tecidos como ovário, endométrio, hipotálamo, músculo liso vascular e endotélio. Evidências sugerem pelo menos três receptores de estrogênio: receptores alfa e beta ( $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ ) ditos como clássicos e receptores de membrana acoplados à proteína G (GPR30) como não clássicos, de efeito não genômico. A regulação dos receptores pode ser dependente do tecido e da duração do tratamento com estrogênio, bem como de outros hormônios e fatores de crescimento (Miller; Duckles 2008).

O estrogênio induz efeitos genômicos e não genômicos na vasculatura. Os genômicos incluem o aumento da transcrição gênica e do crescimento e proliferação celular. Os efeitos não genômicos são respostas rápidas, independentes da síntese de proteínas, via receptor de membrana para o hormônio.

Há evidências que o GPR30 se liga especificamente com o estradiol, tendo alta afinidade e agindo independentemente dos receptores clássicos (Nascimento et al. 2009).

Os hormônios ovarianos exercem ações em órgãos ou tecidos relacionados a vários sistemas, como o cardiovascular. Os estrogênios no sistema cardiovascular e no sangue exercem efeitos sobre a composição dos vasos, diminuindo sua permeabilidade, ativando a coagulação, diminuindo os níveis de colesterol plasmático. Possuem efeito protetor contra o infarto do miocárdio, por reduzir os níveis plasmáticos de colesterol e a aterogênese. Assim, a ausência estrogênica leva ao surgimento de sintomas nestes órgãos-alvo (Babiker et al. 2002; Gruber et al. 2002; Levin 2002).

Os níveis circulantes desses hormônios pode não refletir aqueles dos tecidos, sendo o estradiol a principal forma circulante em mulheres (Miller; Duckles 2008).

Em mulheres na menopausa, a produção ovariana de estradiol diminui acentuadamente e o nível de estrogênio plasmático fica reduzido, principalmente sob a forma de estrona. Estes níveis de estrogênio são quase tão baixos como os observados no sexo masculino.

O hormônio sexual estrogênio é predominante em mulheres, atuando no desenvolvimento e função do sistema reprodutor feminino, como também de outros tecidos, incluindo o tecido adiposo, nervos e sistema cardiovascular. Na vasculatura, sua administração aguda melhora a resposta vasodilatadora, diminuindo a resistência e aumentando o fluxo sanguíneo. Modula o tônus vascular atuando sobre células do endotélio, da musculatura lisa vascular e na matriz extracelular, regulando substâncias vasodilatadoras, como óxido nítrico e prostaciclina e vasoconstritoras como endotelina 1 e angiotensina II (Nascimento et al. 2009; Smiley; Khalil 2009).

Os efeitos do estrogênio sobre a função cardíaca são um campo crescente de investigação. As ações estrogênicas na função mitocondrial, aumento da produção de energia (fosforilação oxidativa), associado com a diminuição da geração de ERO

podem contribuir para a capacidade do estrogênio de modular uma série de doenças, como aquelas relacionadas à disfunção endotelial.

Estudos em humanos demonstraram que a expressão ER $\beta$  é reforçada na parede vascular de mulheres com doenças cardiovasculares, enquanto a do ER $\alpha$  predomina no grupo controle. Isto sugere que o direcionamento seletivo de subtipos de receptores para estrogênio pode ter um efeito sobre a saúde cardiovascular das mulheres (Nascimento et al. 2009).

O estrogênio é metabolizado principalmente no fígado via complexo P450, tendo seus metabólitos menos ativos excretados na urina e nas fezes. Seu metabolismo varia dependendo da fase do ciclo menstrual, menopausa, etnia e polimorfismos genéticos. Com o envelhecimento, as alterações do metabolismo do estrogênio podem modificar seus efeitos via receptores nos vasos (Nascimento et al. 2009).

Algumas propriedades antioxidantes do estrogênio incluem a redução da expressão da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, a produção de radical superóxido e peroxinitrito, e o aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (Trachootham et al. 2008).

## 1.6 ESTROGÊNIO, ESTRESSE OXIDATIVO E INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

As doenças cardiovasculares desenvolvem-se de maneiras diferentes entre os gêneros masculino e feminino, tanto em seres humanos como em animais experimentais. A taxa de incidência das doenças cardiovasculares é menor em mulheres pré-menopausa do que em homens e aumentada agudamente após esse período (Smiley; Khalil 2009; Mercurio et al. 2010).

Muitos estudos demonstraram uma redução de doenças cardíacas com reposição hormonal em mulheres pós-menopausa. Dessa forma, os mesmos apontam para o efeito protetor do estrogênio na doença cardiovascular; mas os mecanismos de proteção não estão inteiramente compreendidos (Nascimento et al. 2009).

Entretanto, alguns estudos com terapia de reposição hormonal, destacando o estudo *Women's Health Initiative* e *Heart and Estrogen/Progestin Replacement*, não mostraram benefícios cardiovasculares, apresentando aumento de doença cardiovascular e eventos cerebrovasculares. Os benefícios da reposição hormonal para o organismo foram inferiores aos riscos (Rossouw et al. 2007; Smiley; Khalil 2009).

Avaliações das alterações do estresse oxidativo no tecido cardíaco, em estudo experimental com ratas submetidas à ovariectomia, através das medidas de lipoperoxidação (LPO) e das enzimas antioxidantes, demonstraram que nove semanas após ovariectomia e sem reposição estrogênica, houve um aumento do estresse oxidativo, com uma redução da atividade antioxidante. No grupo com reposição de  $17\beta$ -estradiol, tais disfunções foram prevenidas. Também ocorreu um aumento da lipoperoxidação no tecido cardíaco do grupo sem reposição e ovariectomizadas. Isso mostrou a potente ação antioxidante do estrogênio, em parte pela sua estrutura hidrofênolica (doa prótons para radicais lipídicos, como o peroxil) que cessa as reações em cadeia da lipoperoxidação, e promove ação neutralizadora frente aos radicais livres. A privação do hormônio estrogênio reduziu significativamente a atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase, contribuindo para aumentar a lipoperoxidação cardíaca (Lima et al. 2007).

Estudos realizados em nosso laboratório (Barp et al. 2002) analisaram os efeitos antioxidantes dos hormônios sexuais, atuando como cardioprotetores, em tecido cardíaco de ratos machos e fêmeas, com ou sem gonadectomia. Foi verificada uma diminuição da atividade da SOD, bem como, um aumento da lipoperoxidação cardíaca nas fêmeas ovariectomizadas, reforçando o potencial antioxidante do estrogênio. Nos machos, a retirada dos hormônios sexuais não promoveu aumento do dano oxidativo no coração.

A mitocôndria é a principal fonte de formação das EROS e desencadeamento do estresse oxidativo. Em seu Razmara et al (2007) avaliaram os efeitos dos hormônios gonadais no estresse oxidativo mitocondrial do cérebro de ratos fêmeas e machos e observaram uma diminuição da atividade da enzima aconitase (indicativo de ERO no cérebro), sugerindo que esses hormônios endógenos estão envolvidos na produção mitocondrial das ERO no cérebro. O hormônio estrogênio aumentou a atividade, mas não as concentrações da enzima superóxido dismutase manganês (MnSOD), que catalisa a dismutação do radical superóxido nas mitocôndrias de cérebro de ratos fêmeas e machos. Os hormônios gonadais influenciam a produção mitocondrial das ERO do cérebro de ratos em ambos os sexos.

A insuficiência cardíaca está associada com um aumento dos efeitos do sistema renina-angiotensina (SRA). A ativação da angiotensina II leva à formação de ERO através do aumento da regulação da NADPH oxidase (Bogaard et al. 2009).

O estudo de (Ahn et al. 2003) objetivou avaliar a importância das funções ovarianas e do SRA na progressão da hipertrofia ventricular direita induzida por monocrotalina em ratas ovariectomizadas. Foi encontrado um aumento da HVD nas fêmeas ovariectomizadas monocrotalina, com aumento da expressão gênica de componentes do SRA no ventrículo direito. O uso de enalapril ou 17 $\beta$ -estradiol

diminuiu significativamente as alterações na estrutura do tecido pulmonar e cardíaco desencadeadas pelo aumento citado do SRA. O hormônio estrogênio, influenciando diretamente o miócito e células vasculares, assim como, a inibição do SRA, tiveram funções protetoras ao desenvolvimento de hipertensão pulmonar e remodelamento cardíaco.

No estudo de (Homma et al. 2006) foi investigado o efeito da genisteína, um fitoestrogênio derivado da soja, na prevenção do desenvolvimento de HAP induzida por MCT em ratos. A genisteína amenizou a diminuição da expressão da enzima eNOS no pulmão desses animais, bem como, atenuou a HAP, hipertrofia de ventrículo direito e o remodelamento vascular.

A predominância da HAP no sexo feminino ainda continua inexplicável, mas muito intrigante pelo fato de ser o oposto da predominância das doenças cardiovasculares em homens (Christou; Khalil 2010).

Alguns estudos têm investigado o papel dos hormônios sexuais na vasorreatividade pulmonar. A testosterona e o estrogênio, quando administrados agudamente, causam vasorrelaxamento das artérias pulmonares em condições de normóxia. Esses efeitos vasomotores do estrogênio e da testosterona são mediados através de mecanismos genômicos e não genômicos. A administração de estrogênio protege contra o remodelamento vascular pulmonar e hipertrofia do ventrículo direito de ratos com HAP (Patel et al. 2008).

Tendo em vista que o hormônio estrogênio pode modular o estresse oxidativo e este está envolvido na HAP, o foco deste estudo foi analisar alguns efeitos frente a essa patologia.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do estrogênio em ratas com *Cor pulmonale* induzido por monocrotalina, através de análises hemodinâmicas, morfométricas e bioquímicas relativas ao estresse oxidativo.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este estudo teve por objetivo, nos distintos grupos experimentais:

- a) quantificar o grau de hipertrofia do ventrículo direito (VD) e cardíaca;
- b) quantificar o imunoconteúdo de ANP no VD;
- c) avaliar o perfil hemodinâmico, através das medidas de pressão ventricular sistólica e diastólica final do ventrículo direito;
- d) realizar a avaliação do estresse oxidativo no VD, através da relação glutatona reduzida/glutatona oxidada (GSH/GSSG) e concentração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ );
- e) medir a lipoperoxidação no VD;
- f) medir a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase no VD.

### **3 HIPÓTESE**

O estresse oxidativo está envolvido na insuficiência cardíaca direita induzida por monocrotalina. O estrogênio, pelo relevante potencial antioxidante, atuando como modulador das concentrações de radicais livres, poderia atenuar a hipertrofia do ventrículo direito e sua progressão para insuficiência cardíaca.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas Wistar fêmeas com dois meses de idade, pesando entre  $180 \pm 50$  g, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os animais foram agrupados em caixas plásticas com medidas de 270 x 260 x 310 mm, com o assoalho recoberto por serragem, sendo quatro animais por caixa, que tiveram acesso à água e ração *ad libitum*. A temperatura ambiente ficou em torno de 22°C mantendo um controle cíclico de 12 horas claro/escuro e umidade relativa de 70%.

Todos os procedimentos com os animais foram de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do grupo de pesquisa e pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Goldim; Raymundo 1997) e conforme a Lei Nº. 11.794, de 08 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal do Brasil, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Projeto nº 2008036).

## 4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram estabelecidos cinco grupos experimentais:

- a) **SHAM (S)**: submetidas apenas à simulação da cirurgia de ovariectomia, não submetidas ao tratamento com MCT;
- b) **SHAM + MCT (SM)**: submetidas à simulação da cirurgia de ovariectomia, e tratadas com MCT;
- c) **OVARIECTOMIA (O)**: submetidas à cirurgia de ovariectomia, não submetidas ao tratamento com MCT;
- d) **OVARIECTOMIA + MCT (OM)**: submetidas à cirurgia de ovariectomia, e tratadas com MCT;
- e) **OVARIECTOMIA + MCT + REPOSIÇÃO ESTROGÊNIO (OMR)**: submetidas à cirurgia de ovariectomia, tratadas com MCT e estrogênio.

## 4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Após vinte e quatro horas da retirada dos animais do biotério, conforme figura 1, os mesmos foram submetidos à cirurgia de ovariectomia ou simulação da mesma. Uma semana depois (7 dias) foi administrada dose única intraperitoneal de MCT ou salina para a indução da hipertensão arterial pulmonar e, colocação de *pellets* com  $17\beta$ -estradiol ou óleo de girassol. Após três semanas (21 dias), os animais foram mortos. Durante o período experimental, os animais foram pesados semanalmente com a finalidade de acompanhamento da evolução do peso corporal.

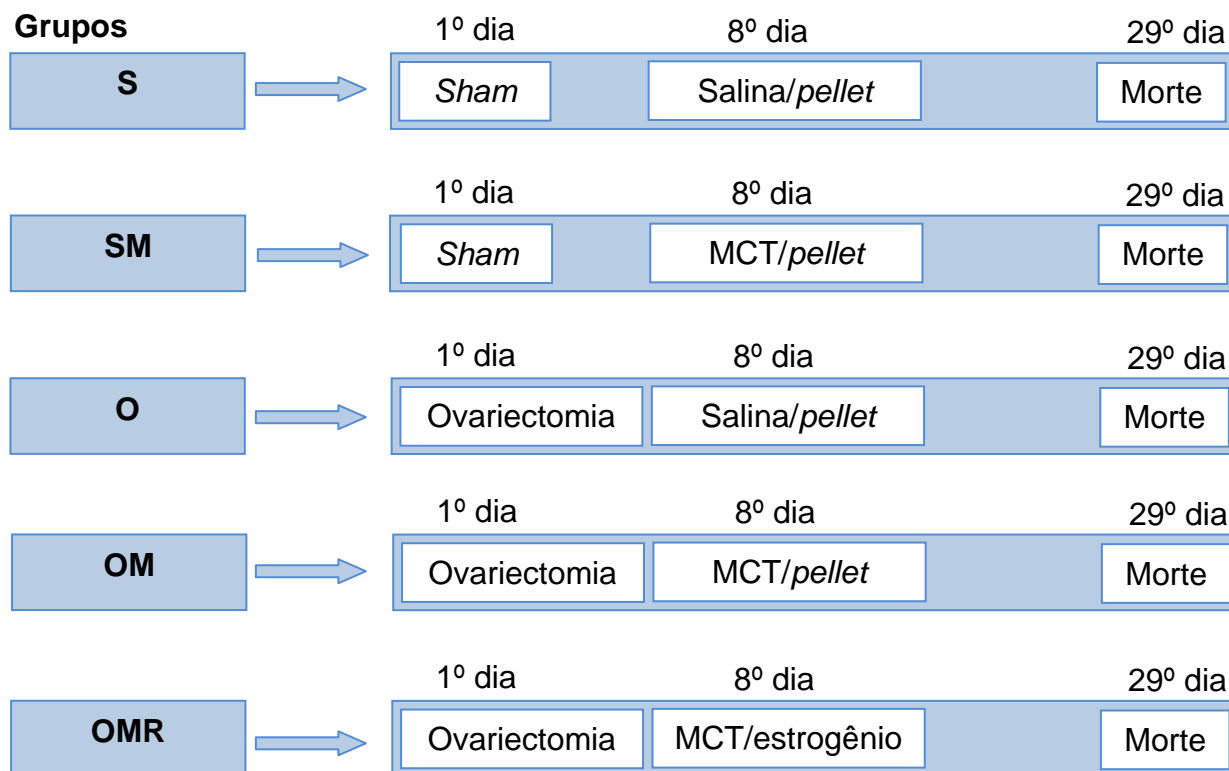


Figura 3- Desenho experimental do estudo

#### 4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO DA OVARIECTOMIA BILATERAL

A ovariectomia é um procedimento cirúrgico que consiste na retirada dos ovários com o objetivo de ocasionar uma redução significativa dos níveis de estrogênio circulantes. As ratas foram anestesiadas com quetamina (90mg/kg) e xilazina (10mg/Kg) por via intraperitoneal. Foi realizada uma incisão lateral logo abaixo do rebordo costal na derme e peritônio, até se visualizar a massa de gordura que circunda o ovário. Depois de identificado efetuou-se a ligadura abaixo da tuba uterina, retirando-o. Após a cirurgia, a sutura da incisão foi realizada em planos separados, com linha de nylon, primeiro a camada muscular e depois a cutânea. O procedimento foi realizado bilateralmente. Nos grupos sham foi realizado o mesmo procedimento; no entanto, não houve ligadura nem a retirada dos ovários.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DO CICLO ESTRAL

Nos animais não submetidos à cirurgia de ovariectomia, a determinação do ciclo estral foi iniciada a partir do 28º dia após o procedimento cirúrgico de simulação da ovariectomia bilateral. O ciclo estral em cada fêmea foi determinado por observação do esfregaço vaginal. A secreção vaginal foi coletada com pipeta de plástico. Solução salina foi colocada na abertura vaginal através da pipeta, aspirada e, colocada em lâminas para serem observadas a fresco no microscópio óptico. As lâminas foram comparadas com os achados de (Freeman 1994). Todos os animais não ovariectomizados foram mortos na fase do diestro.

#### 4.6 REPOSIÇÃO ESTROGÊNICA

Uma cânula de silicone com 15 mm de comprimento (1,02 mm d.i x 2,16 mm d.e) foi preenchida com 10µL de solução 5% (p:v) 17β-estradiol (Sigma chemical Co., St Louis, MO) em óleo de girassol, sendo vedada após com cola de silicone. As cápsulas foram mantidas em solução salina durante a noite antecedente a sua utilização e foram implantadas na região subcutânea entre as escápulas das ratas anestesiadas com quetamina (90mg/kg) e xilazina (10mg/Kg). Todos os animais receberam cânulas contendo apenas óleo de girassol, exceto o grupo OMR que recebeu 17β-estradiol (Prediger et al. 2004).

#### 4.7 INDUÇÃO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

Para indução da hipertensão arterial pulmonar foi aplicada uma injeção intraperitoneal, dose única para cada animal (60mg/kg) da droga MCT (WERCHAN et al., 1989). A preparação da MCT foi realizada de acordo (Singal et al. 2000). Os animais dos grupos S e O receberam uma injeção com mesmo volume e via de administração de solução salina, nas mesmas condições experimentais. A MCT foi administrada sete dias após a cirurgia de ovariectomia.

#### 4.8 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA

Após o período de tratamento, os animais foram novamente pesados (peso corporal final) e anestesiados com quetamina (90mg/kg) e xilazina (10mg/Kg) para que pudesse ser realizada a avaliação hemodinâmica. A veia jugular direita foi exposta e um cateter de polietileno (PE-50) foi implantado e introduzido até o átrio e ventrículo direito conectado a um transdutor de pressão (Strain-Gauge-Narco Biosystem Transducer RP-155, Houston, Texas, USA) e acoplado a um amplificador de sinais (Pressure Amplifier HP 8850C) para monitoração da pressão sistólica e diastólica ventricular direita. Os sinais analógicos da pressão foram digitalizados (Windaq – Data Acquisition System, PC 486) com taxa de amostragem de 1000 Hz (Lüdke et al. 2010).

Após obtermos estes dados, com o animal ainda anestesiado, o mesmo foi morto através de deslocamento cervical. O coração foi rapidamente retirado da cavidade torácica e pesado em uma balança digital para que pudéssemos realizar o cálculo do Índice de Hipertrofia Cardíaca ( $IHC = \text{peso do coração em miligramas/}$

peso corporal em gramas), o qual oferece uma noção do aumento da massa muscular do coração (Hu et al. 2003).

Feitas estas medidas, o coração de cada animal devidamente identificado foi homogeneizado para serem realizadas as medidas bioquímicas.

#### 4.9 PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS

O coração foi rapidamente retirado e homogeneizado por 30 segundos em Ultra-Turax, na presença de cloreto de potássio (KCl) 1,15% (5mL/g de tecido) e de fluoreto de fenil metil sulfonil (PMSF), na concentração de 100 mmol/L em isopropanol (10 $\mu$ L/mL de KCl adicionado). O PMSF é um inibidor de proteases e é utilizado para que não ocorra a degradação das enzimas, as quais foram medidas. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado por 20 minutos a 3000g em uma centrífuga refrigerada (Sorvall RC5B – Rotor SM 24) e o sobrenadante foi aliqotado e armazenado em freezer a -80°C, para realização das medidas determinadas (Llesuy et al. 1985).

#### 4.10 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

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



#### 4.11 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA TOTAL E REDUZIDA

Para determinar a glutaciona total, um fragmento do tecido cardíaco foi retirado do coração e desproteínizado com ácido perclórico 2 mol/L e centrifugado por 10 minutos a 1000g. O sobrenadante foi neutralizado com hidróxido de potássio 2 mol/L. O meio de reação conteve tampão fosfato 100mmol/L (pH 7,2), NADPH 2 mmol/L, glutaciona redutase 0,2 U/mL, ácido ditionitrobenzóico 70 µmol/L. Na determinação da glutaciona reduzida, o sobrenadante neutralizado reagirá com ácido ditionitrobenzóico 70 µmol/L e foi lido no espectrofotômetro a 420nm (Akerboom; Sies 1981).

#### 4.12 MEDIDA DO 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. Fatias de tecido cardíaco foram incubadas por 30 minutos em tampão fosfato 10 mmol/L (NaCl 140 mmol/L e dextrose 5 mmol/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 1 mol/L e efetuou-se a leitura a 610 nm. Os resultados foram expressos em nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por mg de proteína (Pick; Keisari 1980).

## 4.13 AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

### 4.13.1 Superóxido dismutase (SOD)

Esta enzima catalisa a reação de dois ânions superóxido, com a consequente formação de peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a catalase e a glutathione peroxidase.

A técnica para determinação da SOD baseou-se na inibição da reação do ânion radical superóxido com o pirogalol. Utilizou-se uma solução tampão (Tris-base 50 mmol/L; EDTA 1 mmol/L em pH 8,2), pirogalol 24 mmol/L (em ácido clorídrico a 10 mmol/L) e catalase 30  $\mu$ mol/L. Para se ter o resultado em unidades de SOD, necessita-se de um fator de calibração. Portanto, fez-se necessário a construção de uma curva padrão com concentrações conhecidas de SOD, disponível comercialmente (Sigma Chemical Co., St Louis, MO).

Desta maneira, calculou-se o fator de calibração necessário para converter a percentagem de inibição da autooxidação em unidades de enzima. No ensaio, adicionou-se à cubeta tampão Tris, catalase, zerou-se o espectrofotômetro e adicionou-se pirogalol, observando a oxidação do mesmo. Sendo assim, obtivemos o máximo de oxidação desta substância, para calcular a percentagem de inibição causada pela SOD das amostras. Com as amostras, procedeu-se da mesma forma, apenas reajustando o volume de tampão de acordo com a quantidade de homogeneizado de tecido adicionado, para se ter um volume final de 1mL. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se

a velocidade de formação do pirogalol oxidado. Os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína (Marklund 1985).

#### **4.13.2 Catalase**

Esta enzima possui atividade apenas para peróxido de hidrogênio, hidroperóxido de metila e etila. É uma hemoproteína que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio. A atividade da enzima catalase pode ser medida através da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio. Este teste consiste em avaliar a diminuição da absorbância no comprimento de onda de 240 nm, sendo esse comprimento onde há a maior absorção pelo peróxido de hidrogênio, utilizando-se cubetas de quartzo.

Neste ensaio, foram utilizados os seguintes reagentes: solução tampão de fosfato de sódio 50 mmol/L (pH 7,4) e peróxido de hidrogênio 0,3 mol/L. Foi monitorada a diminuição da absorbância do peróxido de hidrogênio no comprimento de onda selecionado. A concentração foi expressa em pmoles/mg de proteína (Aebi 1984).

#### **4.13.3 Glutationa peroxidase (GPx)**

Esta enzima catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutaciona reduzida (GSH), formando glutaciona oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido. A sua atividade pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução da GSSG à GSH. A amostra foi previamente preparada adicionando-se uma mistura de cianetos para inibir a atividade pseudo-

peroxidativa da hemoglobina. Desta forma, a atividade da GPx foi medida em espectrofotômetro, observando-se a diminuição de absorbância do NADPH a 340 nm. Os resultados foram expressos em nmoles por minuto/mg de proteína (Flohe; Gunzler 1984).

#### 4.14 QUIMILUMINESCÊNCIA (QL)

O método consiste na adição de um hidroperóxido orgânico de origem sintética ao homogeneizado de tecido, para avaliação da capacidade de resposta produzida pela amostra. A realização deste tipo de teste consiste no fato de que os hidroperóxidos são espécies químicas bastante instáveis, reagindo com lipídios por um mecanismo radicalar que gera produtos que emitem luz pela amostra em estudo. Este método é um dos mais sensíveis para a medida de lipoperoxidação. A quimiluminescência foi medida em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Bromma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. As determinações foram realizadas a sala escura, com frascos de vidro mantidos na penumbra, a fim de evitar a ativação da fosforescência pela luz fluorescente. O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistiu em 3,5mL de solução reguladora (KCL 140mmol/L e fosfatos 20mmol/L pH 7,4), na qual foi adicionado 0,5mL de homogeneizado. Após, foi realizado uma leitura inicial, considerando a emissão de luz basal pelo homogeneizado. O hidroperóxido orgânico utilizado foi o hidroperóxido de tert-butila 400mmol/L, sendo adicionados 30 µL no meio da reação, para uma concentração final de 3mmol/L. Foi medida a emissão de luz e, desta, foi descontada a emissão

basal para fins de cálculos. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps) por mg de proteína (Gonzalez Flecha et al. 1991).

#### 4.15 EXPRESSÃO PROTÉICA DO ANP POR *WESTERN BLOT*

A eletroforese e a transferência de proteína foram feitas conforme já descrito por Laemmli (Laemmli 1970). As concentrações de proteína foram analisadas e utilizadas para normalizar a quantidade de proteína. 90 µL foram expostos à eletroforese em gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando 10% (p/v) de gel separador e 5% de gel fixador. As proteínas separadas foram transferidas através de eletroforese para membranas usando tampão Towbin modificado, contendo Tris 20mmol/L, glicina 150mmol/L, metanol 20% (v/v), SDS 0,02% (p/v) (pH 8,3) em uma unidade de transferência Bio-Rad resfriada. Após, os sítios de proteínas inespecíficas foram bloqueados através de 1h de incubação em solução bloqueadora – 5% (p/v) de leite desnatado – em tampão Tris salina 0,1% (p/v), tween-20. As membranas foram processadas por imunodeteção usando-se os seguintes anticorpos: *rabbit anti-ANP* como anticorpo primário e *goat anti-rabbit IgG* conjugado com peroxidase de rabanete como anticorpo secundário e as membranas foram reveladas por quimiluminescência. As autorradiografias geradas foram quantitativamente analisadas com um densitômetro de imagem (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences Europe, IT). Os pesos moleculares das bandas foram determinados usando como referência um marcador padrão de peso molecular (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). Os resultados para cada membrana foram

normalizados de acordo com o método de Ponceau red (Klein et al. 1995) e expressos como % de pixels.

#### 4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Efetuados todos os testes, foram calculadas as médias e os desvios-padrão das médias para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. Após aplicação do teste de normalidade *Shapiro-Wilk*, os dados que apresentaram distribuição normal, foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA) fatorial para a comparação entre os grupos, complementado com o teste *Post Hoc Tukey*. Para os dados que não tiveram distribuição normal, foi aplicado o teste não paramétrico *Kruskal Wallis* para a comparação entre os grupos, complementado com teste-T. A correlação foi feita através do teste de correlação de *Pearson*.

Foi utilizado o software SPSS, versão 15.0. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS

Os resultados apresentados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média para cada variável analisada nos diferentes grupos.

Os animais foram pesados semanalmente, do início até o fim do protocolo experimental, com intuito de acompanhar o ganho de peso corporal (Tabela 1). A média do peso corporal inicial mostrou-se homogênea, sem diferença significativa entre os grupos. Já em relação ao peso corporal final houve um ganho de peso significativo do grupo O sobre o grupo S. O grupo OMR diminuiu em relação ao O ( $P < 0,05$ ).

Tabela 1 – Medida do peso corporal antes e após 21 dias da administração de monocrotalina (60 mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, associado ou não com reposição de estrogênio

| Variáveis | S                  | SM                 | O                               | OM                 | OMR                             |
|-----------|--------------------|--------------------|---------------------------------|--------------------|---------------------------------|
| PCI (g)   | 210,56 $\pm$ 27,01 | 196,29 $\pm$ 16,58 | 218,83 $\pm$ 20,59              | 214,83 $\pm$ 20,78 | 216,23 $\pm$ 14,52              |
| PCF (g)   | 243,56 $\pm$ 28,22 | 228,36 $\pm$ 14,92 | 269,08 $\pm$ 17,80 <sup>a</sup> | 250,08 $\pm$ 23,51 | 234,00 $\pm$ 17,23 <sup>b</sup> |

Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão, n= 9-14/grupo. S = sham; SM = sham + monocrotalina; O = ovariectomia; OM = ovariectomia + monocrotalina; OMR = ovariectomia + monocrotalina + reposição de estrogênio. PCI, peso corporal inicial; PCF, peso corporal final.

**a** – significativamente diferente quando comparado ao grupo S ( $P < 0,05$ ).

**b** – significativamente diferente quando comparado ao grupo O ( $P < 0,05$ ).

A hipertrofia cardíaca foi analisada pelo peso do coração (VD + VE + septo) dividido pelo peso corporal final do animal. A relação da massa do VD pelo peso corporal final indica a hipertrofia ventricular direita. Com o intuito de observarmos a eficácia da ovariectomia e da reposição hormonal foi analisado o peso úmido dos cornos uterinos dos animais. O peso do útero mostrou-se diminuído em 71% no grupo O em relação ao grupo S. Também ocorreu redução de 76% do grupo OM em comparação ao grupo SM. Já o grupo OMR demonstrou um aumento significativo de 373% e 300% em relação aos grupos OM e O, respectivamente.

Em nenhuma das determinações, para a verificação da hipertrofia, observou-se diferença significativa entre os grupos ( $P < 0,05$ ), conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Medidas morfométricas do coração após 21 dias da administração de monocrotalina (60 mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, associado ou não com reposição de estrogênio.

| Variáveis          | S           | SM          | O                        | OM                       | OMR                        |
|--------------------|-------------|-------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Coração/PCF (mg/g) | 2,67 ± 0,10 | 2,68 ± 0,14 | 2,58 ± 0,18              | 2,58 ± 0,31              | 2,77 ± 0,21                |
| VD/PCF (mg/g)      | 0,66 ± 0,05 | 0,67 ± 0,11 | 0,65 ± 0,07              | 0,73 ± 0,10              | 0,71 ± 0,07                |
| Peso útero (mg)    | 0,45 ± 0,03 | 0,46 ± 0,05 | 0,13 ± 0,01 <sup>a</sup> | 0,11 ± 0,01 <sup>b</sup> | 0,52 ± 0,07 <sup>c d</sup> |

Valores expressos como média ± desvio padrão, n=9-14/grupo. S = sham; SM = sham + monocrotalina; O = ovariectomia; OM = ovariectomia + monocrotalina; OMR = ovariectomia + monocrotalina + reposição de estrogênio. PCF, peso corporal final; VD, ventrículo direito. Não houve diferença significativa nos parâmetros em ambos os grupos. Significativamente  $P < 0,05$ .

**a** – significativamente diferente quando comparado ao grupo S ( $P < 0,05$ ).

**b** – significativamente diferente quando comparado ao grupo SM ( $P < 0,05$ ).



c – significativamente diferente quando comparado ao grupo O (P < 0,05).

d – significativamente diferente quando comparado ao grupo OM (P < 0,05).

A análise da congestão hepática e pulmonar (Tabela 3) foi realizada através de duas medidas: a razão entre peso úmido do órgão e peso corporal final do animal (mg/g) e a razão entre peso úmido e peso seco do órgão (mg/mg).

O grupo O mostrou uma diminuição significativa de 10% da congestão hepática quando comparado ao grupo S. O grupo OMR apresentou um aumento de 32% e 23% quando relacionado aos grupos O e OM, respectivamente.

A congestão pulmonar apresentou-se aumentada significativamente no grupo OM em relação ao grupo O, em ambos os índices. No grupo OMR, verificou-se uma diminuição significativa de aproximadamente 21% na razão entre peso do pulmão e peso corporal, e 11% na razão entre peso úmido e seco do órgão (P < 0,05).

Tabela 3 - Medidas morfométricas do fígado e pulmão (congestão hepática e pulmonar), após 21 dias da administração de monocrotalina (60 mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, associado ou não com reposição de estrogênio.

| Variáveis          | S            | SM           | O                         | OM                       | OMR                         |
|--------------------|--------------|--------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Fígado/PCF (mg/g)  | 37,11 ± 2,67 | 35,69 ± 2,19 | 33,44 ± 2,31 <sup>a</sup> | 35,75 ± 3,31             | 43,99 ± 3,65 <sup>b,c</sup> |
| Fígado U/S (mg/mg) | 3,32 ± 0,12  | 3,27 ± 0,09  | 3,28 ± 0,06               | 3,30 ± 0,12              | 3,31 ± 0,10                 |
| Pulmão/PCF (mg/g)  | 5,36 ± 0,50  | 6,12 ± 0,64  | 5,16 ± 0,68               | 6,70 ± 0,90 <sup>b</sup> | 5,31 ± 0,57 <sup>c</sup>    |
| Pulmão U/S (mg/mg) | 3,37 ± 0,24  | 3,48 ± 0,25  | 3,42 ± 0,37               | 3,74 ± 0,22 <sup>b</sup> | 3,34 ± 0,21 <sup>c</sup>    |

Valores expressos como média ± desvio padrão, n=9-14./grupo. S = sham; SM = sham +

monocrotalina; O = ovariectomia; OM = ovariectomia + monocrotalina; OMR = ovariectomia + monocrotalina + reposição de estrogênio. PCF, peso corporal final; U/S = peso úmido por peso seco.

**a** – significativamente diferente quando comparado ao grupo S ( $P < 0,05$ ).

**b** – significativamente diferente quando comparado ao grupo O ( $P < 0,05$ ).

**c** – significativamente diferente quando comparado ao grupo OM ( $P < 0,05$ ).

## 5.2 AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS HEMODINÂMICAS

A análise dos registros hemodinâmicos de pressão diastólica final do ventrículo direito (PDFVD) e pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD) em mmHg, e frequência cardíaca (FC) em bpm dos animais, foi realizada através de cateterismo da veia jugular direita (Tabela 4).

Observou-se aumento significativo da PDFVD de 122% do grupo OM quando comparado ao grupo SM. Não houve diferença nos grupos quanto à PSVD e FC ( $P < 0,05$ ).

Tabela 4 - Parâmetros hemodinâmicos em VD após 21 dias da administração de monocrotalina (60 mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, associado ou não com reposição de estrogênio.

| Variáveis    | S              | SM             | O              | OM                        | OMR            |
|--------------|----------------|----------------|----------------|---------------------------|----------------|
| PDFVD (mmHg) | 5,15 ± 2,67    | 5,82 ± 2,80    | 7,11 ± 3,04    | 12,89 ± 2,92 <sup>e</sup> | 15,16 ± 1,17   |
| PSVD (mmHg)  | 30,71 ± 3,03   | 38,18 ± 9,67   | 32,27 ± 6,44   | 41,96 ± 8,53              | 39,36 ± 13,09  |
| FC (bpm)     | 255,36 ± 35,12 | 270,22 ± 29,35 | 241,85 ± 26,28 | 233,74 ± 26,51            | 240,12 ± 20,33 |

Valores expressos como média ± desvio padrão, n=4-10/grupo. S = sham; SM = sham + monocrotalina; O = ovariectomia; OM = ovariectomia + monocrotalina; OMR = ovariectomia +

monocrotalina + reposição de estrogênio. PDFVD, pressão diastólica final do ventrículo direito; PSVD, pressão sistólica do ventrículo direito; FC, frequência cardíaca.

e – significativamente diferente quando comparado ao grupo SM ( $P < 0,05$ ).

### 5.3 AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS

As análises realizadas no homogeneizado do VD, para verificação no dano oxidativo a lipídios, na atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx, e nos níveis de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), são mostradas na Tabela 5. O dano a lipídios ou lipoperoxidação foi observado através da quimiluminescência (QL), não apresentando diferença significativa entre os grupos. O mesmo ocorreu com a atividade das enzimas antioxidantes e com a concentração de  $H_2O_2$  ( $P < 0,05$ ).

Tabela 5 – Parâmetros bioquímicos após 21 dias da administração de monocrotalina (60 mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, associado ou não com reposição de estrogênio.

| Variáveis                | S             | SM            | O             | OM            | OMR          |
|--------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| QL (cps/mg prot.)        | 46125 ± 11716 | 44691 ± 6523  | 49900 ± 10964 | 48230 ± 13524 | 50331 ± 8574 |
| CAT (pmol/mg prot.)      | 58,3 ± 29,6   | 16,6 ± 5,1    | 20,3 ± 8,6    | 18,3 ± 7,8    | 18,7 ± 6,9   |
| SOD (U/mg prot.)         | 12,1 ± 4,2    | 11,3 ± 1,8    | 10,5 ± 2,6    | 9,5 ± 3,6     | 11,1 ± 2,0   |
| GPx (nmol/min/mg prot.)  | 57,5 ± 22,5   | 42,2 ± 8,3    | 30,0 ± 8,7    | 32,7 ± 5,5    | 35,7 ± 9,9   |
| $H_2O_2$ (pmol/mg prot.) | 293,5 ± 124,3 | 210,6 ± 151,0 | 206,7 ± 79,7  | 355,3 ± 158,7 | 183,6 ± 93,6 |

Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão, n=3-10/grupo. S = sham; SM = sham + monocrotalina; O = ovariectomia; OM = ovariectomia + monocrotalina; OMR = ovariectomia + monocrotalina + reposição de estrogênio. QL, quimiluminescência; CAT, catalase; SOD, superóxido dismutase; GPx, glutathione peroxidase; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrogênio. Não houve diferença significativa nos parâmetros em ambos os grupos. Significativamente P < 0,05.

Também foi analisada a capacidade antioxidante não enzimática, mostrada através da concentração da glutathione (GSH) total, que não demonstrou uma diferença significativa entre os grupos (P < 0,05). O mesmo ocorreu quando analisado a concentração da glutathione oxidada (GSSG) nos diferentes grupos, conforme (Figuras 4 e 5).

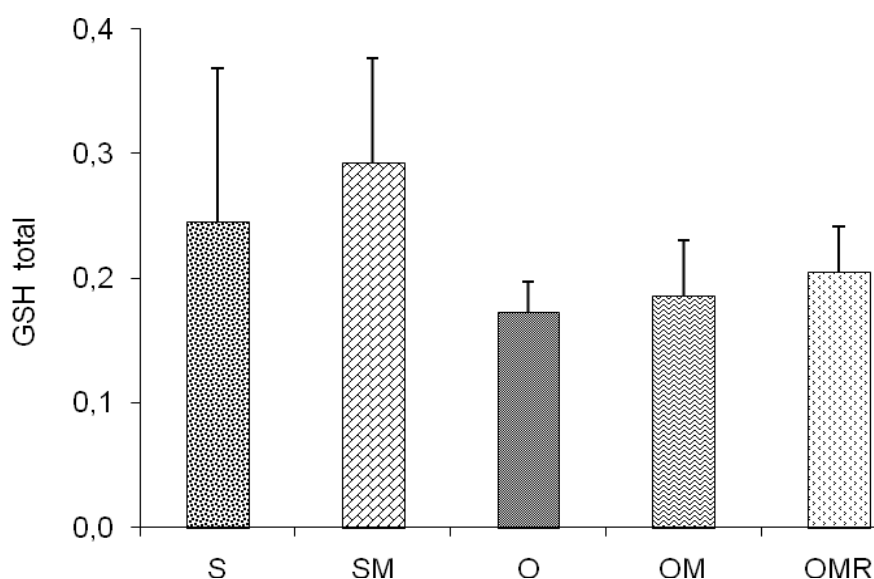


Figura 4 - Concentração da GSH total após 21 dias da administração de monocrotalina (60 mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, associado ou não com reposição de estrogênio.

Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão, n=7-10/grupo. S = sham; SM = sham + monocrotalina; O = ovariectomia; OM = ovariectomia + monocrotalina; OMR = ovariectomia + monocrotalina + reposição de estrogênio. GSH total, glutathione total. Sem diferença significativa (P < 0,05).

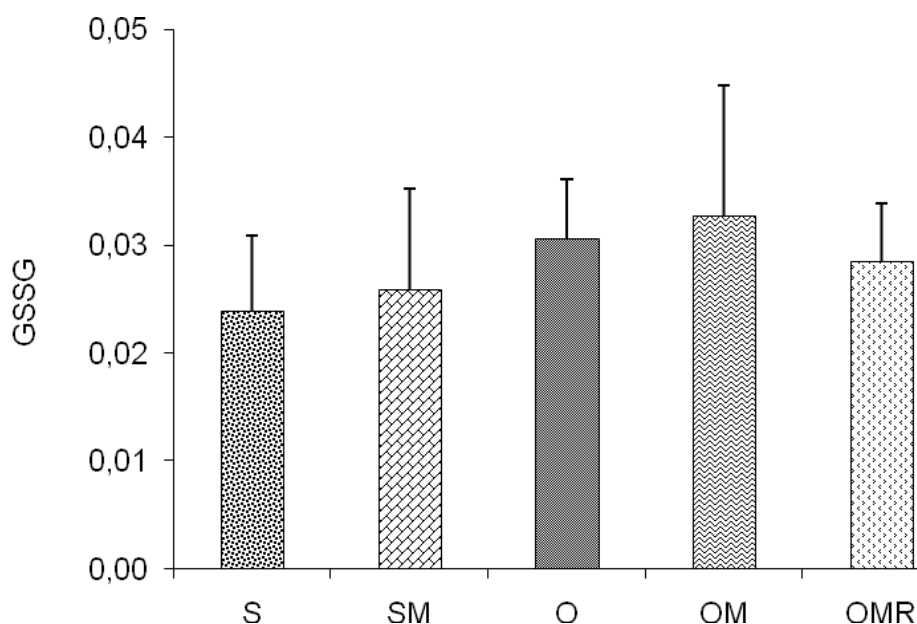


Figura 5 - Concentração da GSSG após 21 dias da administração de monocrotalina (60 mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, associado ou não com reposição de estrogênio.

Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão, n=7-11/grupo. S = sham; SM = sham + monocrotalina; O = ovariectomia; OM = ovariectomia + monocrotalina; OMR = ovariectomia + monocrotalina + reposição de estrogênio. GSH total, glutathiona total. Sem diferença significativa ( $P < 0,05$ )

Na avaliação da glutathiona reduzida (GSH), observou-se uma diminuição significativa de 53% no grupo O quando comparado ao grupo S (Figura 6). Da mesma forma, o grupo OM apresentou uma redução de 47% da concentração da GSH em relação ao grupo SM ( $P < 0,05$ ).

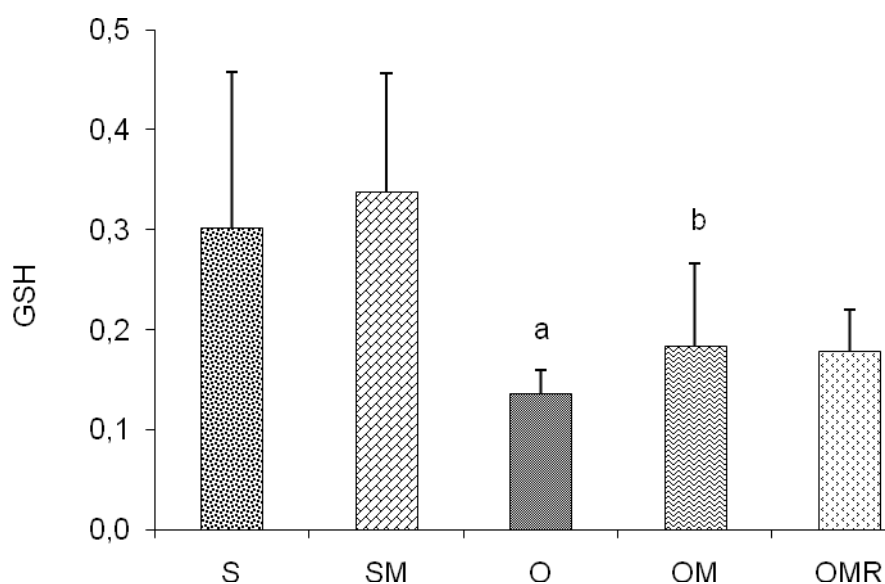


Figura 6 - Concentração da GSH após 21 dias da administração de monocrotalina (60 mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, associado ou não com reposição de estrogênio.

Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão, n=7-11/grupo. S = sham; SM = sham + monocrotalina; O = ovariectomia; OM = ovariectomia + monocrotalina; OMR = ovariectomia + monocrotalina + reposição de estrogênio. GSH, glutathiona reduzida. **a** – significativamente diferente quando comparado ao grupo S ( $P < 0,05$ ). **b** – significativamente diferente quando comparado ao grupo SM ( $P < 0,05$ ).

A razão GSH/GSSG, que representa o estado redox da célula, apresentou redução significativa de 62% no grupo O em comparação ao grupo S. Houve também uma diminuição de 57% no grupo OM e de 53% no grupo OMR, quando relacionados ao grupo SM, sendo significativa para um  $P < 0,05$  (Figura 7).

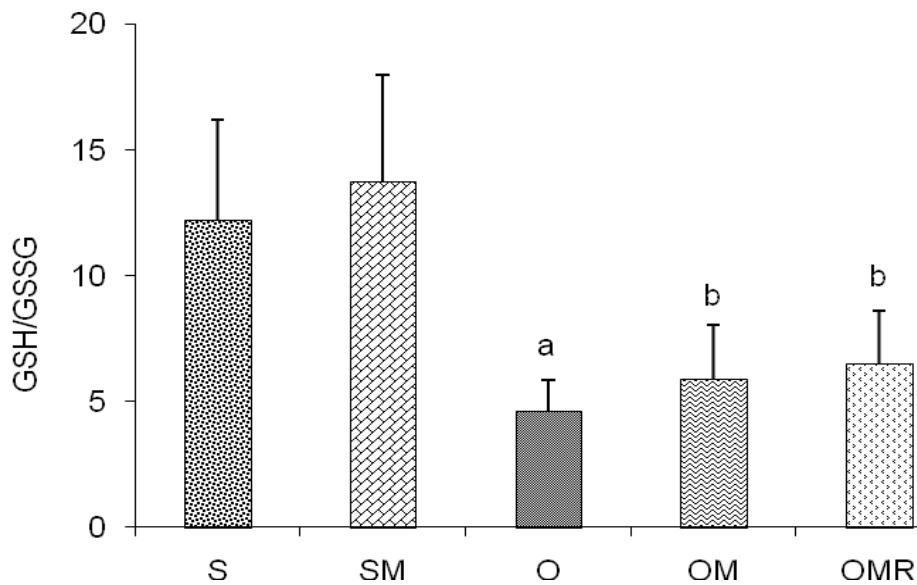


Figura 7 - Razão da GSH/GSSG após 21 dias da administração de monocrotalina (60 mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, associado ou não com reposição de estrogênio.

Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão, n=7-11/grupo. S = sham; SM = sham + monocrotalina; O = ovariectomia; OM = ovariectomia + monocrotalina; OMR = ovariectomia + monocrotalina + reposição de estrogênio. GSH, glutathiona reduzida. **a** – significativamente diferente quando comparado ao grupo S ( $P < 0,05$ ). **b** – significativamente diferente quando comparado ao grupo SM ( $P < 0,05$ ).

Em relação à correlação da GSH pela PDFVD, a mesma apresentou uma correlação forte negativa. Isto é, quanto maior a concentração da GSH, menor a PDFVD. Tendo um  $r=0,60$  e  $P= 0,005$  (Figura 8).

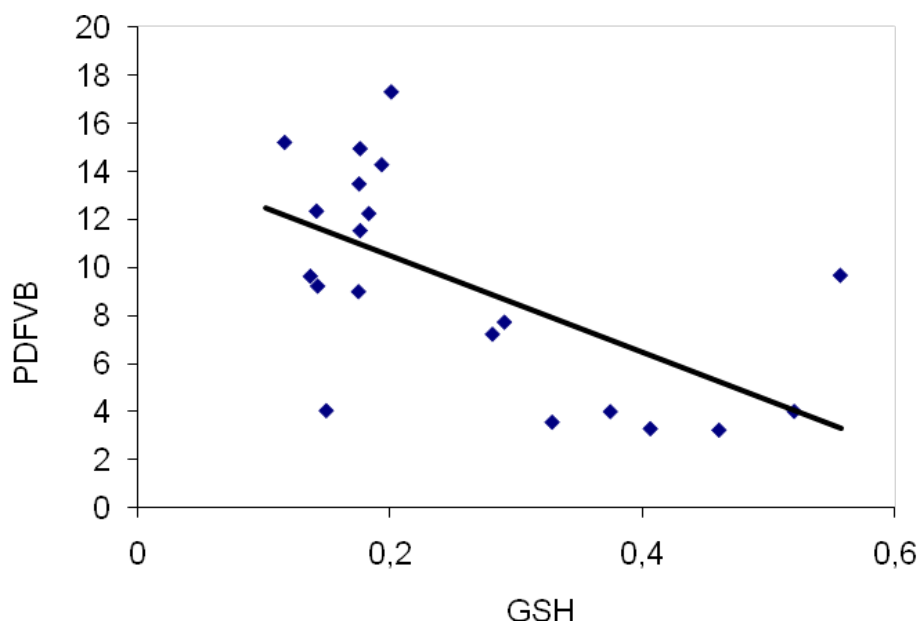


Figura 8 - Correlação da concentração de GSH com a PDFVD após 21 dias da administração de monocrotalina (60 mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, associado ou não com reposição de estrogênio.

$r = -0,6$ ;  $P = 0,005$

O imunoconteúdo do ANP, peptídeo utilizado como marcador de hipertrofia cardíaca, mostrou-se alterado nos diferentes grupos. Ocorreu um aumento de 56% no grupo SM em relação ao grupo S, e de 51% quando comparado com o grupo OMR e diminuiu 33% do grupo OMR comparando com o O (Figura 9).



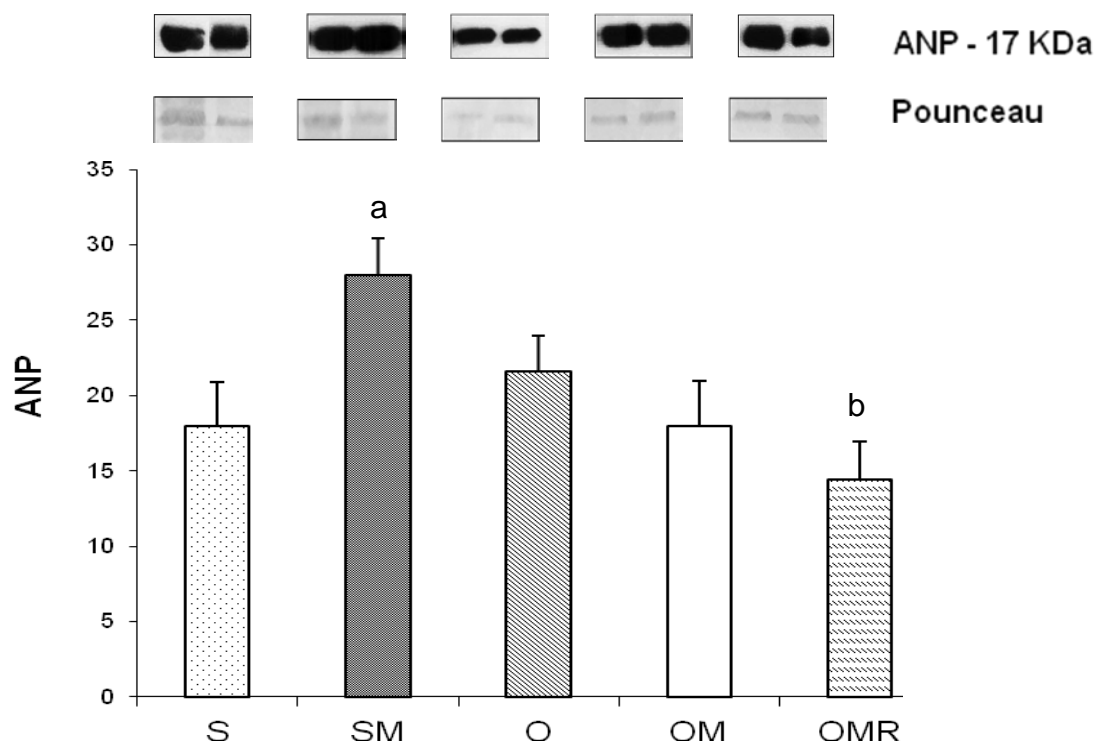


Figura 9 – Imunoconteúdo do ANP após 21 dias da administração de monocrotalina (60 mg/kg i. p) em ratas ovariectomizadas ou não, associado ou não com reposição de estrogênio.

Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão, n=3/4 grupo. S = sham; SM = sham + monocrotalina; O = ovariectomia; OM = ovariectomia + monocrotalina; OMR = ovariectomia + monocrotalina + reposição de estrogênio. GSH, glutathiona reduzida.

**a** – significativamente diferente quando comparado ao grupo S ( $P < 0,05$ ).

**b** – significativamente diferente quando comparado ao grupo O ( $P < 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi demonstrado um importante papel do estrogênio na atenuação da congestão pulmonar induzida por monocrotalina. Além disso, foi verificado que, nos animais ovariectomizados, o balanço redox mostrou-se alterado, ao mesmo tempo em que a pressão diastólica final do VD (PDFVD) e a congestão pulmonar mostraram-se aumentadas.

Nosso grupo de pesquisa possui experiência prévia na utilização deste modelo experimental, tendo verificado o papel do treinamento físico (Souza-Rabbo et al. 2008) e da administração de suco de uva (Ludke et al. 2010) na modulação do *Cor pulmonale*. Este estudo foi o primeiro produzido neste laboratório utilizando fêmeas. Portanto, fizemos uma abordagem ampla de marcadores clássicos de estresse oxidativo no ventrículo direito, assim como a avaliação de parâmetros morfométricos e hemodinâmicos.

Tem sido demonstrado na literatura que, após 7 dias de castração, os animais já simulam sintomas da menopausa, não sendo mais detectados níveis plasmáticos de estrogênio (Barp et al. 2002). Neste trabalho, foi utilizado, para comprovar a eficácia da castração e da reposição hormonal, o peso do útero dos animais. Foi clara a redução do peso do útero dos animais ovariectomizados, indicando a eficácia da cirurgia. Nas ratas com reposição estrogênica, o aumento do peso do útero mostrou-se significativamente maior quando comparado aos seus controles. Segundo Gorodeski (Gorodeski et al. 1995) o aumento do peso do útero, até três vezes maior do que os animais castrados, é um sinal de que a reposição hormonal foi eficiente. Apesar de não terem sido avaliadas, neste estudo, as concentrações hormonais, há fortes indícios de que a castração e a reposição

estrogênica foram efetivas. Estudo prévio realizado neste laboratório demonstrou que a reposição estrogênica utilizada promove uma elevação da concentração de estradiol da ordem de  $63,3 \pm 2,8$  pg/mL (Schenkel 2006).

Em nosso experimento, a monocrotalina foi administrada intraperitonealmente na dose única de 60 mg/kg. Foram observadas alterações já descritas na literatura: modificações morfométricas e hemodinâmicas nos animais, que caracterizam o modelo de *Cor pulmonale* (Farahmand et al. 2004). Ahn et al 2003 (Ahn et al. 2003) observaram, com dose de 60 mg/kg de monocrotalina, que ratos machos e fêmeas tratados com a droga apresentaram congestão pulmonar, e menor ganho de peso corporal final. A congestão pulmonar verificada em nosso estudo, no grupo OM, se mostrou semelhante ao encontrado no trabalho de Ahn, diferentemente do grupo OMR, que teve essa variável atenuada. Em relação à avaliação morfométrica do ventrículo direito, as fêmeas com estrogênio e MCT não desenvolveram hipertrofia desta câmara cardíaca. Quando realizada a cirurgia de ovariectomia e administração de MCT, foi observado aumento da hipertrofia, semelhante ao que ocorreu nos machos com MCT. Neste estudo, não houve hipertrofia cardíaca em nenhum dos grupos experimentais.

Alguns parâmetros da nossa pesquisa se mostraram diferentes quando comparados aos resultados obtidos com ratos machos, conforme constatado em trabalhos anteriores do nosso laboratório. No estudo de (Souza-Rabbo et al. 2008) foi observado um menor ganho de peso corporal final nos grupos tratados com monocrotalina, em relação aos seus controles. Lüdke et al., em 2010, também verificaram diminuição do ganho de peso em ambos os grupos tratados com a droga. Já neste estudo, percebemos que a monocrotalina, não está interferindo no ganho de peso corporal final, visto que, não houve diferença significativa nos grupos

tratados com MCT. Contudo, observamos que houve um aumento significativo no grupo O comparado com seu controle (S), apontando possível papel do estrogênio nessa alteração. O aumento do ganho de massa corporal no grupo O sobre seu controle S, pode ser explicado pelos efeitos do estrogênio em promover crescimento e diferenciação do tecido adiposo, entre outros tecidos (Smiley; Khalil 2009). Não foram visualizados alguns sinais característicos da insuficiência cardíaca direita induzida por monocrotalina: cianose, letargia, dispnéia e perda de pêlo (Ludke et al. 2010).

Outra diferença observada, na distinção de gênero, foi que as fêmeas não apresentaram hipertrofia ventricular direita. Sugere-se que a pós-carga imposta ao VD, esteja sendo atenuada pela ação do estrogênio sobre a vasculatura pulmonar, regulando o tônus, aumentando expressão gênica de enzimas como a óxido nítrico sintase e diminuindo o espessamento da túnica média vascular pulmonar (Miller; Duckles 2008; Smiley; Khalil 2009), assim como a ação promovida pelos metabólitos do estrogênio sobre a regulação dos níveis de AMPc nas células endoteliais vasculares (Tofovic et al. 2009).

Segundo (Kiyatake et al. 1992), havia concentrações significativamente menores dos metabólitos da degradação da MCT em homogeneizados de fígado de ratos fêmeas quando comparados aos fígados de ratos machos, associando esses resultados com menor pressão ventricular observada nas ratas (Farhat et al. 1993).

Quando observamos o imunoconteúdo do ANP no VD, notamos um aumento no grupo SM, sugerindo que, mesmo sem apresentar diferenças quanto ao índice de hipertrofia, podemos ter uma sinalização diferenciada para a hipertrofia do ventrículo direito nesses dois grupos. Segundo (De Andrade et al. 2011), o estrogênio é capaz de modular a liberação, síntese e expressão gênica do ANP, e seu efeito, segundo

(Kilic et al. 2009) é considerado dose-dependente, podendo atuar como um hormônio anti-hipertrófico ou pró-hipertrófico. Dessa forma, a hipertrofia não foi verificada nessa janela temporal e nessa dose hormonal, mas não descartamos a possibilidade de que este evento possa acontecer em períodos subsequentes.

Outras alterações morfométricas encontradas, que caracterizam o modelo experimental, foram: a presença de congestão pulmonar e hepática. A administração de monocrotalina gera disfunção endotelial na vasculatura pulmonar e essa contribui para o aumento da resistência vascular pulmonar (RVP). Essa RVP modificada propicia um aumento na pós-carga imposta ao VD, e sua função tende a ficar prejudicada, levando ao edema pulmonar nos grupos com monocrotalina (Souza-Rabbo et al. 2008). Observamos que nos grupos com estrogênio fisiológico (grupos S e SM) não houve edema pulmonar, mas quando retiramos o hormônio e administramos MCT (grupos O e OM) este parâmetro mostrou-se elevado, o que era esperado pelo efeito da MCT. Quando foi repostado o estrogênio (grupo OMR), os níveis de congestão pulmonar retornaram aos seus níveis de controle. Essa atenuação da congestão pulmonar pelo estrogênio vem ao encontro dos estudos (Tofovic et al. 2005; Tofovic et al. 2006; Tofovic et al. 2008) que mostraram a ação do  $17\beta$ -estradiol e seus metabólitos em inibir a proliferação, migração e produção de colágeno de células do músculo liso vascular, fibroblastos cardíacos, bem como atenuar a produção de endotelina pelas células endoteliais. Especificamente o metabólito 2-metoxiestradiol atenuou a elevação da pressão arterial pulmonar e inibiu o remodelamento vascular pulmonar em ratos machos e fêmeas com HAP induzida por monocrotalina. A ocorrência de congestão hepática no grupo OMR, pode ser inferida pela toxicidade gerada pelo metabolismo da monocrotalina no fígado (Farhat et al. 1993).

Em relação aos dados hemodinâmicos, observamos que a PDFVD mostrou-se semelhante nos grupos com estrogênio fisiológico (grupos S e SM) e aumentada nos grupos sem o hormônio (O, OM), mesmo depois da sua reposição (OMR). Supõe-se que o estrogênio, como comentado anteriormente, esteja diminuindo a resistência vascular pulmonar, efeito evidenciado pela diminuição do edema pulmonar no grupo OMR, mas que ainda não conseguiu aliviar o VD em termos de sobrecarga de pressão. Isso pode ser explicado pelas propriedades anti-inflamatórias e de vasorrelaxamento, que são observadas quando da administração aguda de estrogênio em artérias pulmonares de ratos em condições normais, conforme demonstrado no estudo de (Patel et al. 2008). Também pela ação do estrogênio na modulação da síntese de NO, através da ativação da enzima NOS e suas isoformas na vasculatura (Xing et al. 2009). Observamos uma manutenção da PSVD, diferentemente de outros estudos, que demonstraram elevação da mesma nos grupos com monocrotalina em ratos machos, nesse período (Souza-Rabbo et al. 2008; Ludke et al. 2010). Nestes estudos, a elevação da pressão sistólica do VD pode estar relacionada à hipertrofia cardíaca produzida em resposta ao aumento da pós-carga. No presente trabalho, esta resposta pode ser atenuada devido à ação do estrogênio amenizando o aumento da pós-carga para o VD e conseqüentemente diminuindo a sinalização para hipertrofia.

Nas análises bioquímicas, em relação à medida que nos informam como está o perfil de estresse oxidativo no ventrículo direito, não houve alterações na lipoperoxidação, na concentração de peróxido de hidrogênio como também nas defesas antioxidantes enzimática mostradas pelas atividades das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, em nenhum dos grupos experimentais. No entanto, o balanço redox se mostrou alterado dramaticamente

pela retirada do estrogênio, ou seja, nos animais que foram castrados cirurgicamente, notamos uma redução nos níveis de GSH e também da relação GSH/GSSG. Estes dados mostram a importância do estrogênio na manutenção do equilíbrio redox celular. Esse hormônio parece desempenhar suas funções de proteção contra o estresse oxidativo através da ativação do seu receptor ER $\alpha$  e aumento da enzima de síntese de glutathione, a  $\gamma$ -glutamyl-cysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS). Essa enzima, conseqüentemente, age preferencialmente na formação de moléculas de GSH (Kondo et al. 2009). Segundo estudo de (Baeza et al. 2010), os animais ovariectomizados apresentaram uma redução na relação GSH/GSSG. Os dados acima vão ao encontro dos obtidos no nosso estudo, onde notamos que essa mesma variável também mostrou uma diminuição significativa em todos os grupos de animais onde os ovários foram retirados (O, OM, OMR). Assim, sugerimos que a ausência do estrogênio nos animais ovariectomizados, seja responsável por um pior estado redox no coração. Nesse mesmo estudo de Baeza, a reposição hormonal foi eficiente em recuperar o balanço redox e os animais desse grupo mostraram um aumento na razão da GSH/GSSG. Essa resposta não foi alcançada no nosso estudo. Nos animais pertencentes ao grupo OMR, verificamos a mesma diminuição observada nos animais O e OM quando comparados aos seus respectivos controles. Dessa forma, acreditamos que a piora acentuada no estado redox desses grupos, seja provocada pela ovariectomia e também pela monocrotalina, explicando a redução nessa relação nos animais OMR. Então, após a administração de monocrotalina, os efeitos benéficos desse hormônio sobre o equilíbrio redox são reduzidos. Foi observada correlação negativa entre GSH e pressão diastólica final do ventrículo direito, sugerindo que a disfunção diastólica do VD esteja relacionada a uma redução desta importante defesa antioxidante não-enzimática.

Neste contexto, observamos que o estrogênio revelou-se importante nas alterações induzidas pela MCT, apontando para um efeito cardioprotetor desse hormônio na HAP.



## CONCLUSÃO

Os dados apresentados levam a concluir que tanto a monocrotalina, quanto a falta de estrogênio pela ovariectomia, são capazes de reduzir a relação GSH/GSSG, aumentar o edema pulmonar e a pressão diastólica final do ventrículo direito. Ao mesmo tempo, a reposição estrogênica foi eficaz em reverter a congestão pulmonar. Pelas alterações descritas, sugere-se que o estrogênio exerça uma forte influência sobre o equilíbrio redox celular, sobre a manutenção da função cardíaca e índice de congestão pulmonar, no modelo experimental de *Cor pulmonale* induzido por monocrotalina.

## **PERSPECTIVAS**

Conforme os achados deste estudo, salienta-se que outras medidas que expressam o perfil de estresse oxidativo poderiam ter sido avaliadas, nesse modelo experimental, tais como concentração de nitritos e nitratos, expressão das isoformas da óxido nítrico sintase e concentração do ânion superóxido, visto que a principal causa da HAP é dada pela disfunção endotelial. Além disso, poderia ser interessante analisar estes parâmetros na circulação pulmonar, por que o modelo tem origem na vasculatura pulmonar.

## REFERÊNCIAS

- Aebi, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol** 105: 121-6.1984
- Ahn, B. H., et al.,. Estrogen and enalapril attenuate the development of right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline in ovariectomized rats. **J Korean Med Sci** 18(5): 641-8.2003
- Akerboom, T. P.; H. Sies. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol** 77: 373-82.1981
- Babiker, F. A., et al.,. Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function. **Cardiovasc Res** 53(3): 709-19.2002
- Baeza, I., et al.,. Effects of growth hormone, melatonin, o estrogens and phytoestrogens on the oxidized glutathione (GSSG)/reduced glutathione (GSH) ratio and lipid peroxidation in aged ovariectomized rats. **Biogerontology** 11(6): 687-701.2010
- Barp, J., et al.,. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. **Braz J Med Biol Res** 35(9): 1075-81.2002
- Baruzzi, A. C. d. A., et al.,. Função do ventrículo direito **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** 47(6): 435-442.1986
- Bhupathy, P., et al.,. Influence of sex hormones and phytoestrogens on heart disease in men and women. **Womens Health (Lond Engl)** 6(1): 77-95.2010
- Bogaard, H. J., et al.,. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. **Chest** 135(3): 794-804.2009
- Casserly, B.; J. R. Klinger. Brain natriuretic peptide in pulmonary arterial hypertension: biomarker and potential therapeutic agent. **Drug Des Devel Ther** 3: 269-87.2009
- Chan, S. Y.; J. Loscalzo. Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. **J Mol Cell Cardiol** 44(1): 14-30.2008
- Chaouat, A., et al.,. Pulmonary hypertension in COPD. **Eur Respir J** 32(5): 1371-85.2008
- Chen, L., et al.,. Attenuation of compensatory right ventricular hypertrophy and heart failure following monocrotaline-induced pulmonary vascular injury by the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange inhibitor cariporide. **J Pharmacol Exp Ther** 298(2): 469-76.2001
- Chin, K. M.; L. J. Rubin. Pulmonary arterial hypertension. **J Am Coll Cardiol** 51(16): 1527-38.2008
- Christou, H. A.; R. A. Khalil. Sex hormones and vascular protection in pulmonary arterial hypertension. **J Cardiovasc Pharmacol** 56(5): 471-4.2010
- Comini, L., et al.,. Aorta and skeletal muscle NO synthase expression in experimental heart failure. **J Mol Cell Cardiol** 28(11): 2241-8.1996
- de Andrade, E. N., et al.,. Natriuretic peptide system: a link between fat mass and cardiac hypertrophy and hypertension in fat-fed female rats. **Regul Pept** 167(1): 149-55.2011
- Doggrell, S. A.; L. Brown. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. **Cardiovasc Res** 39(1): 89-105.1998
- Droma, Y., et al.,. Positive association of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with high-altitude pulmonary edema. **Circulation** 106(7): 826-30.2002

- Farahmand, F., et al.,. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. **Mol Cell Biochem** 260(1-2): 21-9.2004
- Farhat, M. Y., et al.,. Protection by oestradiol against the development of cardiovascular changes associated with monocrotaline pulmonary hypertension in rats. **Br J Pharmacol** 110(2): 719-23.1993
- Flohe, L.; W. A. Gunzler. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol** 105: 114-21.1984
- Franchini, K. G. Mecanismos moleculares na hipertrofia cardíaca. **Hipertensão** 5(3).2002
- Freeman, M. E. (1994). Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. **The physiology of reproduction**. K. E ; N. JD. New York, Raven Press.
- Giordano, F. J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. **J Clin Invest** 115(3): 500-8.2005
- Goldim, J.; M. Raymundo (1997). **Pesquisa em saúde e direito dos animais**. Porto Alegre, HCPA.
- Gonzalez Flecha, B., et al.,. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radic Biol Med** 10(2): 93-100.1991
- Gorodeski, G. I., et al.,. Effects of estrogen in vivo on coronary vascular resistance in perfused rabbit hearts. **Am J Physiol** 269(6 Pt 2): R1333-8.1995
- Gruber, C. J., et al.,. Production and actions of estrogens. **N Engl J Med** 346(5): 340-52.2002
- Halliwell, B. G., J. C. (1999). **Free Radical in Biology and Medicine**. Oxford, Clarendon Press.
- Homma, N., et al.,. Genistein, a phytoestrogen, attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Respiration** 73(1): 105-12.2006
- Hu, L. W., et al.,. Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 285(6): R1473-80.2003
- Kilic, A., et al.,. Estrogen exerts concentration-dependent pro-and anti-hypertrophic effects on adult cultured ventricular myocytes. Role of NHE-1 in estrogen-induced hypertrophy. **J Mol Cell Cardiol** 46(3): 360-9.2009
- Kiyatake, K., et al.,. Role of liver microsome for sexual difference in monocrotaline-treated rats. **Am. Rev. Respir. Dis**: 145.1992
- Klein, D., et al.,. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. **Biochem Mol Biol Int** 36(1): 59-66.1995
- Kögler, H., et al.,. Mechanical load-dependent regulation of gene expression in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in the rat. **Circ Res** 93(3): 230-7.2003
- Kondo, T., et al.,. Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis. **J Atheroscler Thromb** 16(5): 532-8.2009
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227(5259): 680-5.1970
- Lehrman, S., et al.,. Primary pulmonary hypertension and cor pulmonale. **Cardiol Rev** 10(5): 265-78.2002
- Levin, E. R. Estrogen receptor-beta and the cardiovascular system. **Trends Endocrinol Metab** 13(5): 184-5.2002
- Lima, S. M. R. R., et al.,. Efeitos da suplementação do 17 $\beta$ -estradiol no dano oxidativo cardíaco de ratas submetidas à privação dos hormônios ovarianos **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** 29(7): 27-33.2007

- Liu, Y. H., 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 Card Fail** 11(1): 74-81.2005
- Llesuy, S. F. (2002). Introdução y especies activas de oxigeno. **Estresse Oxidativo e antioxidantes**. N. P. Marroni. Porto Alegre, Ulbra.
- Llesuy, S. F., et al.,. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. **Tumori** 71(3): 241-9.1985
- Lowry, O. H., et al.,. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem** 193(1): 265-75.1951
- Ludke, A. R., et al.,. Modulation of monocrotaline-induced cor pulmonale by grape juice. **J Cardiovasc Pharmacol** 55(1): 89-95.2010
- MacCarthy, P. A.; A. M. Shah. Oxidative stress and heart failure. **Coron Artery Dis** 14(2): 109-13.2003
- Magalhães, F. C., et al.,. Hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento físico: eventos moleculares e celulares que modificam o fenótipo. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte** 7(1): 189.2008
- Marklund (1985). Pyrogallol autooxidation **Handbook of Methods for Oxygen Radical Research** Greenwald, Press boca raton: 243-247.
- Mercuro, G., et al.,. Gender determinants of cardiovascular risk factors and diseases. **J Cardiovasc Med (Hagerstown)** 11(3): 207-20.2010
- Miller, V. M.; S. P. Duckles. Vascular actions of estrogens: functional implications. **Pharmacol Rev** 60(2): 210-41.2008
- Nascimento, G. R. d., et al.,. Research into Specific Modulators of Vascular Sex Hormone Receptors in the Management of Postmenopausal Cardiovascular Disease. **Curr Hypertens Rev** 5(4): 283-306.2009
- Patel, K. M., et al.,. The effects of endogenous sex hormones and acute hypoxia on vasoconstriction in isolated rat pulmonary artery rings. **J Surg Res** 146(1): 121-6.2008
- Piao, L., et al.,. Mitochondrial metabolic adaptation in right ventricular hypertrophy and failure. **J Mol Med** 88(10): 1011-20.2010
- Pichardo, J., et al.,. Myocardial oxidative stress changes during compensated right heart failure in rats. **Mol Cell Biochem** 196(1-2): 51-7.1999
- Pick, E.; Y. Keisari. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J Immunol Methods** 38(1-2): 161-70.1980
- Prediger, M. E., et al.,. Estradiol protects against oxidative stress induced by chronic variate stress. **Neurochem Res** 29(10): 1923-30.2004
- Rossouw, J. E., et al.,. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. **JAMA** 297(13): 1465-77.2007
- Santos, A. P. B., et al.,. Crotalaria retusa: Atividade farmacológica de monocrotalina e de seu derivado N-óxido. **30º REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA - Programa e Resumos**.2007
- Schenkel, P. C. (2006). Influência do óxido nítrico na resposta à isquemia-repercussão em ratas sob distintas concentrações estrogênicas. **Departamento de Fisiologia**. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado.
- See, F., et al.,. p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and attenuates left ventricular remodeling following myocardial infarction in the rat. **J Am Coll Cardiol** 44(8): 1679-89.2004

- Simonneau, G., et al.,. Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. **Journal of the American College of Cardiology** 54(1 Suppl S): S43–54.2009
- Singal, P. K., et al.,. Oxidative stress in congestive heart failure. **Curr Cardiol Rep** 2(3): 206-11.2000
- Smiley, D. A.; R. A. Khalil. Estrogenic compounds, estrogen receptors and vascular cell signaling in the aging blood vessels. **Curr Med Chem** 16(15): 1863-87.2009
- Souza-Rabbo, M. P., et al.,. Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 35(8): 944-8.2008
- Tofovic, P. S., et al.,. Effects of estradiol metabolites on cAMP production and degradation. **Prilozi** 30(1): 5-24.2009
- Tofovic, S. P., et al.,. Estradiol metabolites attenuate monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **J Cardiovasc Pharmacol** 46(4): 430-7.2005
- Tofovic, S. P., et al.,. 2-Methoxyestradiol mediates the protective effects of estradiol in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Vascul Pharmacol** 45(6): 358-67.2006
- Tofovic, S. P., et al.,. 2-Ethoxyestradiol is antimitogenic and attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling. **Vascul Pharmacol** 48(4-6): 174-83.2008
- Trachootham, D., et al.,. Redox regulation of cell survival. **Antioxid Redox Signal** 10(8): 1343-74.2008
- Tsutsui, H., et al.,. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. **Cardiovasc Res** 81(3): 449-56.2009
- Valko, M., et al.,. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol** 39(1): 44-84.2007
- Xing, D., et al.,. Estrogen and mechanisms of vascular protection. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 29(3): 289-95.2009
- Yildiz, P. Molecular mechanisms of pulmonary hypertension. **Clin Chim Acta** 403(1-2): 9-16.2009