

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Instituto de Ciências Básicas da Saúde**  
**Departamento de Fisiologia**  
**Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia**

**Efeitos do Treinamento Físico no Perfil  
Hemodinâmico e no Estresse Oxidativo em  
modelo experimental de *Cor pulmonale*.**

**Tese 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 Doutor.**

**Maristela Padilha de Souza Rabbo**  
**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriane Belló Klein**

**Porto Alegre, 2005.**



Um homem precisa viajar por sua conta,  
não por meio de histórias, imagens, livros ou TV.  
Precisa viajar por si, com seus olhos e pés para entender o  
que é seu,  
para um dia plantar suas próprias árvores  
e dar-lhes valor.  
Conhecer o frio para desfrutar do  
calor e o oposto.  
Sentir a distância e o desabrigo  
para estar bem sobre o próprio teto.  
Um homem precisa viajar para lugares que não conhece, para quebrar  
esta arrogância que nos faz ver o mundo  
como imaginamos  
e não simplesmente como é.  
Que nos faz professores e doutores do que não vimos,  
quando deveríamos  
ser alunos e simplesmente ir ver.  
(Amyr Klink)

### Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, tornaram possível a realização deste trabalho, em particular, aos colaboradores do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e aos professores e funcionários do curso de Pós-Graduação do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo incentivo financeiro.

Em especial, meus agradecimentos e admiração à minha orientadora, Professora Adriane Belló Klein pela competência e incentivo com que me conduziu durante a elaboração deste trabalho e, ao Auní, meu companheiro nas trilhas da vida.

Dedicatória.

Dedico este trabalho àquele que, entre provérbios clássicos, ditos populares e teorias científicas, fazia da rotina da pesquisa um aprendizado de vida.

Dedico este trabalho àquele que, com fé, determinação e extremo bom humor, encarava os desafios da vida. Dedico este trabalho àquele que foi incentivador incondicional do saber.

Dedico este trabalho ao fundador do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dedico este trabalho ao, para sempre mestre, Professor Antonio Andréa Belló (1938-2001)

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>IX</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Hipertensão Pulmonar .....	2
1.1.2 “ <i>Cor pulmonale</i> ”.....	3
1.2 Modelos experimentais de insuficiência cardíaca.....	4
1.2.1 <i>Monocrotalina Como Modelo de Indução de Hipertensão Pulmonar e Insuficiência Cardíaca</i> .....	5
1.3 Estresse Oxidativo .....	9
1.4 Hipertrofia cardíaca .....	12
1.5 Estresse Oxidativo e Insuficiência Cardíaca.....	13
1.6 Exercício, Estresse Oxidativo e Insuficiência Cardíaca .....	14
1.7 Hipótese.....	19
1.8 Objetivos.....	20
1.8.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	20
1.8.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	20
<b>2 MATERIAIS e MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
2.1 Animais.....	21
2.2 Grupos Experimentais .....	21
2.3 Protocolo experimental .....	22
2.4 Protocolo de Treinamento.....	22
2.5 Indução de Hipertensão Pulmonar e Insuficiência cardíaca .....	24
2.6 Avaliação Hemodinâmica .....	24
2.7 Análise da derivada de contração e relaxamento do ventrículo esquerdo .....	25
2.8 Hipertrofia Cardíaca.....	25
2.9 Nível de Congestão Hepática e Pulmonar .....	25
2.10 Preparação do Tecido.....	25
2.11 Preparação do Sangue .....	26
2.12 Quantificação de Proteínas.....	26
2.13 Dosagem de Hemoglobina .....	27
2.14 Quimiluminescência (QL).....	27
2.15 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	28
2.16 Superóxido Dismutase (SOD).....	28
2.17 Glutathiona Peroxidase (GPx) .....	29
2.18 Catalase (CAT) .....	30
2.19 Glutathiona S-transferase (GST) .....	30
2.20 Análise Estatística .....	31
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
3.1 Resultados referentes à evolução do peso corporal dos distintos grupos experimentais nos diferentes tempos de tratamento. ....	33

---

<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
4.1 Dados morfológicos.....	35
4.1.1 <i>Desenvolvimento corporal, pulmão e fígado.</i> .....	35
4.1.2 <i>Hipertrofia de ventrículo direito</i> .....	37
4.2 Dados Hemodinâmicos.....	39
4.2.1 <i>Pressões diastólica e sistólica final de ventrículo direito</i> .....	39
4.2.2 <i>Derivadas de contratilidade e relaxamento</i> .....	40
4.3 Dados de Estresse Oxidativo.....	42
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>48</b>
<b>6 PERSPECTIVAS de ESTUDO.....</b>	<b>50</b>
<b>7 BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>51</b>

**LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

Figura 1.1: estrutura química e metabolismo da monocrotalina. .... 6

Figura 1.2: planta *Crotalaria spectabilis*. .... 7

Figura 1.3: metabolismo e mecanismo de ação da monocrotalina ..... 8

Figura 1.4: danos aos lipídios de membrana (LPO) causado pela ação das  
espécies reativas de oxigênio (ERO). .... 10

Figura 2.1: animais executando uma sessão do protocolo  
de treinamento físico. .... 23

Tabela 2.1: protocolo de treinamento físico. .... 23

Figura 3.1: evolução do peso corporal durante o período experimental..... 34

Figura 4.1: mecanismos propostos para a melhora da função vascular induzida  
pelo exercício. .... 42

Figura 4.2: esquema final.....47

**LISTA DE ABREVIATURAS**

CAT	catalase
DPOC	doença pulmonar obstrutiva crônica
ENOs	óxido nítrico sintase endotelial
EO	estresse oxidativo
ERO	espécie reativas de oxigênio
ET-1	endotelina
GPx	glutathione peroxidase
GSH	glutathione reduzida
GSSG	glutathione oxidada
GST	glutathione S-transferase
HP	hipertensão pulmonar
HVD	hipertrofia de ventrículo direito
IC	insuficiência cardíaca
ICC	insuficiência cardíaca congestiva
LPO	lipoperoxidação
MAPK	proteína mitógeno ativada
NO	óxido nítrico
QL	quimiluminescência.
SOD	superóxido dismutase
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
VO <sub>2</sub> máx.	consumo máximo de oxigênio
CT	grupo controle treinado
CS	grupo controle sedentário
MS	grupo monocrotalina sedentário
MT	grupo monocrotalina treinado



## RESUMO

Já está bem estabelecido na literatura que as doenças pulmonares podem causar diretamente alterações na mecânica cardíaca. Estas alterações acarretam prejuízos que invariavelmente induzem o estabelecimento da insuficiência cardíaca. Aproximadamente 30% dos casos de insuficiência cardíaca estão relacionados à falência do ventrículo direito, sendo que esta situação é a principal causa de morbidade e mortalidade pós-transplante cardíaco. As alterações patológicas do ventrículo direito resultantes da disfunção do pulmão são denominadas de *Cor pulmonale*. Estas manifestações, quando crônicas, se caracterizam por hipertrofia e dilatação do ventrículo direito secundária à hipertensão pulmonar, evoluindo progressivamente para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva. Embora os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da insuficiência cardíaca ainda não tenham sido completamente elucidados, vários estudos apontam para a participação das espécies reativas de oxigênio (ERO) nestes processos. A utilização da droga monocrotalina (MCT) para desenvolvimento de *Cor pulmonale*, é o modelo experimental mais amplamente aplicado para o estudo de hipertensão pulmonar, hipertrofia seletiva de ventrículo direito e insuficiência cardíaca.

Apesar da constante evolução no desenvolvimento de fármacos que melhorem tanto a morbidade quanto a mortalidade de portadores de doenças cardiorrespiratórias, a utilização de terapêuticas não farmacológicas como o exercício físico, principalmente em programas de reabilitação, tem demonstrado resultados positivos no tratamento destas doenças. Um dos mecanismos responsáveis por estes benefícios é a modulação do estresse oxidativo.

O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações induzidas por um protocolo de treinamento físico, em parâmetros morfométricos (evolução do peso corporal, congestão hepática e

pulmonar, hipertrofia cardíaca), hemodinâmicos (pressão sistólica e diastólica final do ventrículo direito (PSVD e PDFVD) e índices de contratilidade e relaxamento ( $\pm dP/dt$ ) e no estresse oxidativo cardíaco avaliado pela atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST), pela quimiluminescência (QL) e pelas espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em ratos tratados com a droga monocrotalina.

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando  $\cong$  180g subdivididos em quatro grupos: controle sedentário (CS), monocrotalina sedentário (MS), controle treinado (CT), e monocrotalina treinado (MT). O treinamento físico constituiu-se de corrida em esteira rolante adaptada (5 vezes por semana, 0.9/0.6 Km/h), durante três, quatro ou cinco semanas. A síndrome *Cor pulmonale* foi induzida por dose única da droga monocrotalina (MCT, 60mg/kg i.p.).

Os animais tratados com MCT apresentaram hipertrofia de ventrículo direito, sendo que na terceira semana de tratamento, o exercício físico foi capaz de evitar o desenvolvimento da mesma.

O tratamento com MCT promoveu um aumento significativo na PSVD e PDFVD, em todos os tempos de tratamento, sendo que o protocolo de treinamento físico foi capaz de atenuar a PDFVD, na quarta semana de tratamento. Ainda com relação aos resultados hemodinâmicos, os animais tratados com MCT apresentaram aumento significativo na  $+dP/dt$  e diminuição significativa  $-dP/dt$  do ventrículo direito, nos três tempos de tratamento. Os animais exercitados apresentaram uma diminuição na  $+dP/dt$  e um aumento na  $-dP/dt$  nestes mesmos períodos experimentais. Em conjunto, estes dados indicam que os animais tratados com MCT se apresentavam em um estágio transitório de insuficiência cardíaca compensada.

Na quarta e quinta semanas, nos animais tratados com MCT, houve um aumento significativo do dano causado aos lipídios de

membrana, medido através da QL em eritrócitos e do TBARS em homogeneizado de tecido cardíaco, sendo este efeito reduzido pelo exercício físico. Com relação aos dados de TBARS, os animais tratados com MCT e exercitados mostraram uma diminuição significativa nos valores quando comparados aos demais grupos, em todos os tempos experimentais.

A atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT GPx e GST avaliadas tanto em eritrócitos quanto em homogeneizado de tecido cardíaco, apresentaram respostas tempo e tecido dependentes. Apesar de que tanto o exercício quanto a MCT tenham sido capaz de modular a ação enzimática antioxidante durante o desenvolvimento do protocolo experimental, as alterações mais significativas foram relacionadas a GPx e GST.

Em conjunto, nossos resultados indicam que o exercício foi capaz de modular as alterações fisiológicas tradicionalmente induzidas pela administração de MCT e que estas alterações foram dependentes do tempo de tratamento e do tecido avaliado. Possivelmente, os benefícios gerados pelo exercício físico tenham sido induzidos por uma melhora nos danos no leito vascular pulmonar com uma conseqüente diminuição da pós-carga imposta ao ventrículo direito, além de uma adaptação positiva do sistema de defesa antioxidante.

Estes resultados corroboram os benefícios da indicação de um programa regular de exercícios físicos tanto para terapêutica de reabilitação quanto para manutenção da qualidade de vida de portadores de hipertensão pulmonar e insuficiência cardíaca direita.

### 1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2020, mais de 40% do total de óbitos da população mundial estará relacionado a doenças cardiovasculares.

No Brasil, segundo dados do Sistema Único de Saúde (SUS), a insuficiência cardíaca (IC) acomete 2 milhões de pacientes, com uma incidência de 240 mil novos casos por ano.

Estes dados, bastante alarmantes, são com certeza motivadores para o grande número de pesquisas desenvolvidas na área da saúde. Principalmente nas últimas duas décadas, se registraram grandes avanços especialmente na área da Farmacologia. Muito já se sabe a respeito de diagnósticos e agentes causadores, mas os verdadeiros fatores e os processos que desencadeiam as doenças cardiovasculares, em especial a síndrome da insuficiência cardíaca, permanecem desconhecidos.

A insuficiência cardíaca é caracterizada por alterações nos parâmetros hemodinâmicos, mudanças em respostas reflexas do sistema nervoso autonômico e modificações no sistema endócrino (ex., sistema renina-angiotensina), que acabam por prejudicar a função cardíaca. A IC pode ser causada por diversos fatores, tais como hipertensão, infarto do miocárdio, defeitos na ação de válvulas cardíacas e cardiomiopatias idiopáticas; assim como, por conseqüências secundárias de determinadas doenças como a diabetes ou intervenções com fármacos como quimioterápicos (Ho et al., 1993). Embora inúmeros avanços em pesquisas no sentido da prevenção e tratamento das manifestações clínicas que culminam com a insuficiência cardíaca tenham sido alcançados, esta doença permanece sendo responsável por um alto índice de morbidade e mortalidade da população mundial.

A maioria dos estudos sobre insuficiência cardíaca está relacionada ao déficit de desempenho do ventrículo esquerdo. Entretanto, aproximadamente 30% dos casos de insuficiência

cardíaca estão relacionados à falência do ventrículo direito (VD), sendo que esta situação é a principal causa de morbidade e mortalidade pós-transplante cardíaco (Lovoulos et al., 2004).

### 1.1 Hipertensão Pulmonar

Além da insuficiência cardíaca, as doenças relacionadas às alterações fisiopatológicas do sistema respiratório representam um grande custo social, sendo responsáveis por altos índices de morbidade e mortalidade da população mundial. A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) se caracteriza pela manifestação de um grupo de desordens que podem incluir tanto condições de obstrução ao fluxo de ar quanto de restrição dos volumes pulmonares. O tabagismo é o principal fator de risco para o desenvolvimento da DPOC (80-90%), sendo que a exposição a ambientes com presença de partículas tóxicas, como resíduos de combustíveis e de produtos industriais, também contribui significativamente.

Nos Estados Unidos, cerca de 14 milhões de indivíduos são portadores de DPOC. Os sintomas como tosse, perda de peso e fadiga precoce se apresentam progressivamente com a evolução da doença. Deste modo, a perda da capacidade funcional pulmonar caracteriza a principal causa de morbidade apresentada por portadores de DPOC.

As alterações dos processos fisiológicos do pulmão que se apresentam na DPOC podem levar ao desenvolvimento da hipertensão pulmonar. A hipertensão pulmonar pode ocorrer como um fenômeno isolado ou associado a várias alterações cardiopulmonares, estando relacionada a altos níveis de morbidade e mortalidade. Ela é uma condição progressiva caracterizada por um aumento da resistência vascular pulmonar e definida como um aumento da pressão arterial pulmonar média.

Atualmente, os tratamentos farmacológicos da DPOC não têm se mostrado eficientes em reverter o quadro da doença, mas são

capazes de retardar a progressão da mesma e garantir uma melhor qualidade de vida. Rosemberg & Resnick (2003) demonstraram que pacientes que participam de programas de reabilitação que incluem a prática regular de exercícios físicos (aeróbios e resistidos), apresentam melhoras tanto na manifestação dos sintomas quanto na qualidade de vida.

A DPOC é um importante fator de risco para o desenvolvimento de outras doenças crônicas onde se incluem as doenças cardiovasculares. Já está bem estabelecido na literatura que as doenças pulmonares podem causar diretamente alterações na mecânica cardíaca. Estas alterações acarretam prejuízos que invariavelmente induzem o estabelecimento da insuficiência cardíaca (Sietsema, 2001).

### 1.1.2 “Cor pulmonale”

As alterações patológicas do ventrículo direito resultantes da disfunção do pulmão são denominadas de “*Cor pulmonale*”. Estas manifestações quando crônicas se caracterizam por hipertrofia e dilatação do VD secundária à hipertensão pulmonar causada por doença do parênquima pulmonar e/ou do sistema vascular (entre a origem da artéria pulmonar e a entrada da veia pulmonar no átrio esquerdo) (Braunwald, 1997).

As modificações, tanto estruturais quanto funcionais, apresentadas pelos pulmões são responsáveis pelo aumento na tensão que o ventrículo direito necessita desenvolver para se contrair. Este aumento na pós-carga imposta ao ventrículo direito é o principal estímulo para o desenvolvimento da hipertrofia (Sietsema, 2001).

As alterações na fisiologia cardiorrespiratória apresentadas nos portadores de *Cor pulmonale* são responsáveis pela limitada capacidade de execução de atividades físicas. Uma ineficiência na oferta de oxigênio, em situações de aumento na demanda energética para o exercício, ocasiona um déficit no consumo de

oxigênio. Esta situação é determinante para o aparecimento da fadiga precoce apresentada por estes indivíduos, determinando incapacidade de execução de suas atividades diárias e, conseqüentemente, diminuição de qualidade de vida.

### **1.2 Modelos Experimentais de Insuficiência Cardíaca**

Nas últimas décadas, pesquisas científicas na área da Cardiologia têm apresentado grande progresso. Hoje em dia, novos medicamentos e terapias não farmacológicas são capazes de atenuar a morbidade e diminuir significativamente os índices de mortalidade em portadores de cardiopatias. Entretanto, com o aumento da expectativa de vida a incidência, prevalência e custos sociais das doenças cardíacas continuam aumentando. Mesmo com a elucidação de diversos mecanismos que induzem à disfunção do miócito cardíaco, ainda persistem questionamentos que impedem o completo entendimento da origem, instalação e desenvolvimento da síndrome da insuficiência cardíaca. A cada nova descoberta, apresentam-se novos desafios e, neste cenário, a utilização de modelos animais representa uma metodologia alternativa de estudo para a comunidade científica.

O emprego de animais como modelo de estudo tem sido utilizado pelo homem por séculos. O uso de modelos com ratos apresenta vantagens em relação ao estudo com humanos, das quais pode-se citar: a disponibilidade de um grande número de amostra, o controle de variáveis que possam interferir no estudo (como nutrição, condições ambientais etc.), o desenvolvimento de estudos crônicos, técnicas invasivas e utilização de drogas citotóxicas. Dentre os vários modelos experimentais de insuficiência cardíaca, a indução de hipertensão pulmonar se apresenta como sendo extremamente eficiente, principalmente para o estudo do mecanismo de desenvolvimento e da evolução da doença. O protocolo com administração da droga monocrotalina

(MCT) é o modelo mais comumente utilizado para indução da hipertensão pulmonar, hipertrofia seletiva do ventrículo direito e conseqüente insuficiência cardíaca (Brown et al., 1998; Hasenfus, 1998; Monnet e Chachques, 2005).

### **1.2.1 Monocrotalina como Modelo de Indução de Hipertensão Pulmonar e Insuficiência Cardíaca**

A monocrotalina é uma substância química classificada como alcalóide macrocíclico pirrolizidina. Os alcalóides pirróis são de origem vegetal, sendo que sua toxicidade depende da sua estrutura química (somente os que possuem ligação dupla na posição 1,2 são tóxicos) (Figura 1.1). Estas plantas são amplamente distribuídas por vários continentes, sendo que mais de 200 tipos foram identificados, em 300 diferentes espécies de plantas de mais de 13 famílias. Embora as plantas não tóxicas sejam comumente utilizadas como fonte de alimentação, substitutos do café, chás, e na Medicina, as que possuem características tóxicas podem crescer como ervas daninhas em plantações e serem colhidas juntamente com os grãos. Em função disto, existem vários eventos documentados de contaminação humana (doença crônica hepática) por ingestão de trigo contaminado no Afeganistão, chá de ervas na Jamaica e pão na África do Sul. Já foi detectada a presença destes alcalóides pirróis no leite de vaca e no mel, tanto nos Estados Unidos quanto na Austrália, mas em concentrações não tóxicas para os humanos (Wilson et al., 1992).



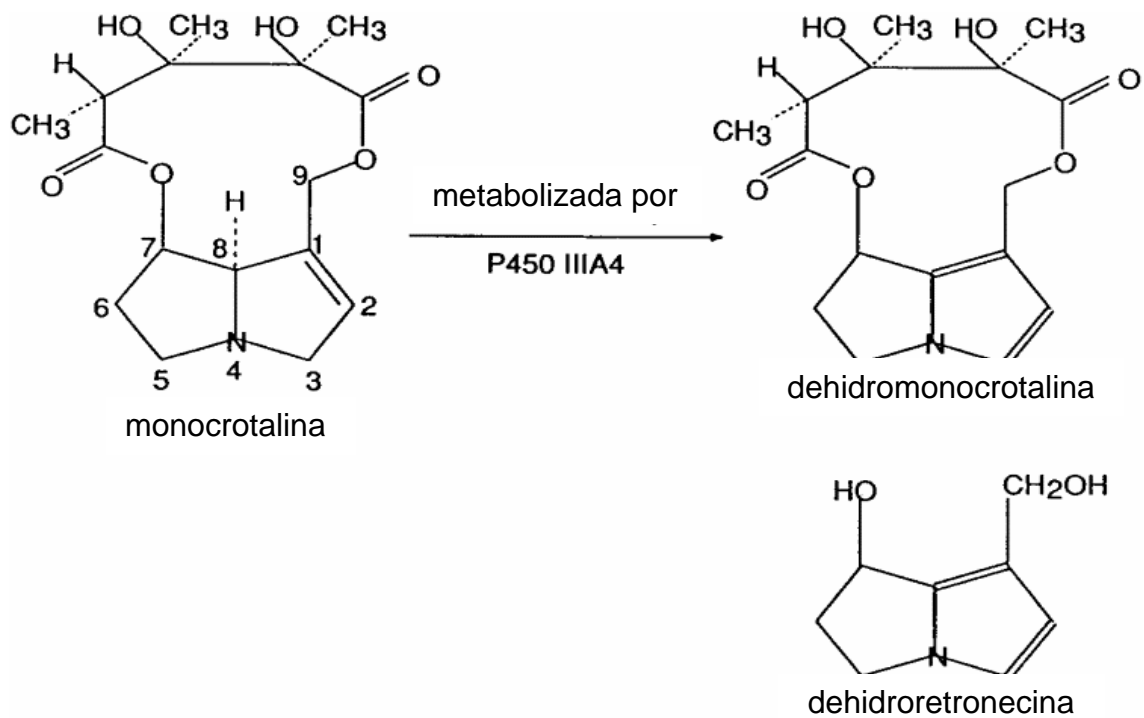


Figura 1.1: estrutura química e metabolismo da monocrotalina.

A monocrotalina é derivada da *Crotalaria spectabilis* (Figura 1.2) e, embora todas as partes da planta sejam tóxicas, vários estudos utilizam a administração direta da semente na dieta de animais. Seu metabolismo hepático gera a dehidromonocrotalina (MCTD), um metabólito reativo, que é subsequente transportado até os pulmões, causando lesão do leito vascular e conseqüente remodelamento estrutural dos mesmos, resultando em hipertensão pulmonar, hipertrofia de ventrículo direito por aumento de pós-carga e conseqüente insuficiência cardíaca (Figura 1.3) (Meyrick et al., 1980). A toxicidade seletiva pelo pulmão é contrária a de outros alcalóides pirróis por diferenças no metabolismo hepático e cinética sangüínea da monocrotalina. A dehidromonocrotalina é acumulada nos eritrócitos onde é estabilizada durante o transporte até o pulmão. Uma segunda fase de metabolismo da MCT é através da conjugação com a glutathiona (GSH) que representa a reação de detoxificação. Em ratos, a droga

causa necrose hepática periacinar somente em altas doses enquanto uma dose única baixa causa hipertensão pulmonar *Cor pulmonale* sem doença hepática. Nem todas as espécies são susceptíveis à MCT, em porcos e aves domésticas, causa toxicidade renal. Embora, somente com algumas exceções, a intoxicação em humanos por ingestão possa causar doença hepática crônica, em 1976 foi registrada, no interior da Índia, uma epidemia de doença hepática veno-oclusiva por contaminação de *Crotalaria* com 267 casos resultando em 28 óbitos (Wilson et al., 1992).



Figura 1.2: planta *Crotalaria spectabilis*.

Uma das principais vantagens da utilização do modelo com monocrotalina é que os resultados apresentados por animais tratados com esta droga, mimetizam várias alterações fisiológicas apresentadas por humanos portadores de hipertensão pulmonar primária e *Cor pulmonale*. Animais tratados com MCT apresentam alterações hemodinâmicas e estruturais do ventrículo direito, como aumento no pico de pressão sistólica e hipertrofia, além de elevada produção de endotelina e peptídeo natriurético atrial no

tecido cardíaco e diminuição na produção de óxido nítrico no endotélio pulmonar. Deste modo, é considerado um modelo apropriado para estudar em maiores detalhes a patofisiologia do desenvolvimento da hipertensão pulmonar, *Cor pulmonale* e insuficiência cardíaca congestiva com a finalidade de identificar novas estratégias terapêuticas em humanos (Doggrell e Brown, 1998; Seyfarth et al., 2000; Wölkart et al., 2000).

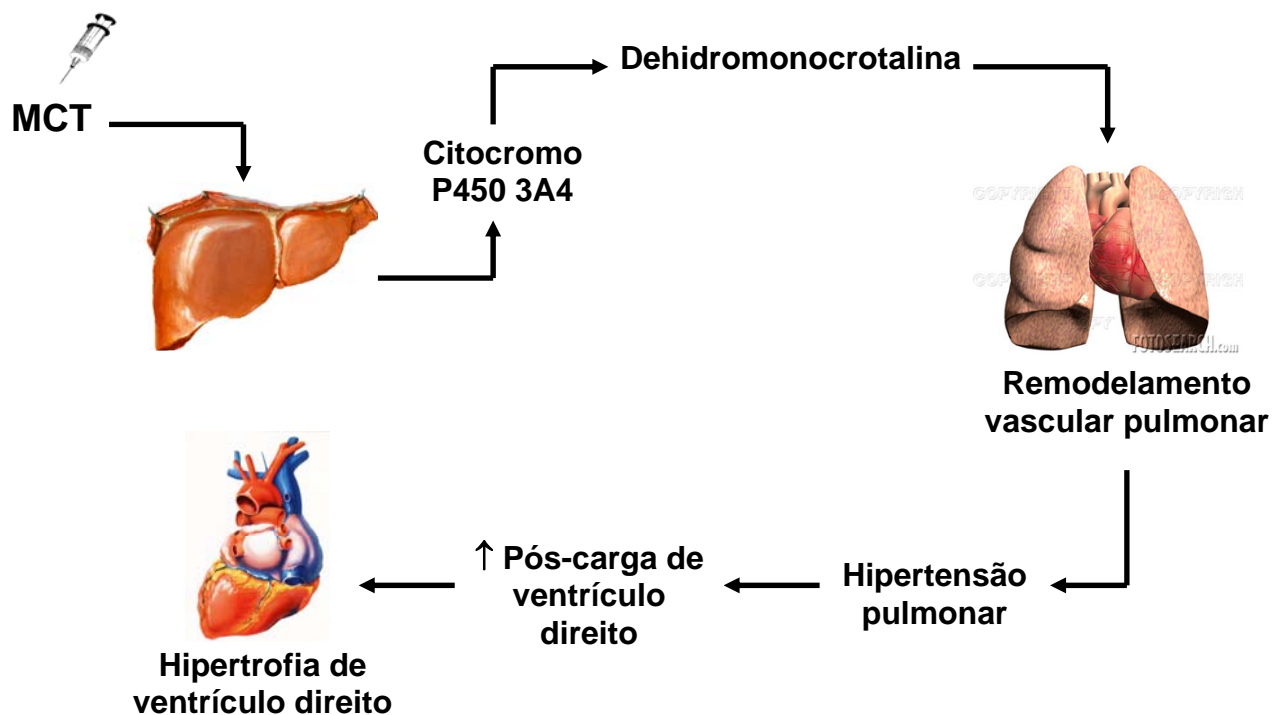


Figura 1.3: metabolismo e mecanismo de ação da monocrotalina no desenvolvimento de hipertensão pulmonar e hipertrofia ventricular direita.

Utilizando o modelo experimental de *Cor pulmonale*, Jong e colaboradores (2000), e Farahmand e colaboradores (2004), descreveram a evidente participação das espécies reativas de oxigênio (ERO) nos diferentes estágios de desenvolvimento tanto de hipertrofia quanto de insuficiência cardíaca. A relação das ERO, das enzimas antioxidantes e do estresse oxidativo na patogênese da insuficiência cardíaca será discutida a seguir.

### 1.3 Estresse Oxidativo

A geração de energia necessária ao metabolismo celular ocorre essencialmente na cadeia respiratória mitocondrial. Dentro da mitocôndria, como resultado final da fase aeróbia deste processo, ocorre a redução tetravalente do oxigênio molecular, ou seja, recebimento de quatro elétrons simultaneamente, com conseqüente formação de água e liberação de energia para ressíntese de ATP. Mas cerca de 5% do oxigênio que entra nesta organela, sofre uma redução monovalente, ou seja, há o recebimento de quatro elétrons, porém cada um separadamente. Durante este processo de redução, ocorre a formação de “*espécies reativas de oxigênio*”, tais como o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ).

Estas espécies reativas, que possuem um elétron desemparelhado no seu orbital mais externo (energético), são denominadas radicais livres (Hiroyuki, 2004). Esta configuração lhes confere uma característica extremamente instável e reativa. Sua interação com elementos biológicos como aminoácidos, DNA e lipídios de membrana levam, quase na maioria dos casos, à lesões irreversíveis nestas estruturas. A *lipoperoxidação* (LPO) é o resultado da oxidação dos lipídios de membrana causada principalmente pelo radical hidroxil (Figura 1.4). Este processo pode levar a danos na integridade da membrana, causando desarranjos na homeostasia celular, podendo inclusive culminar com morte celular. Várias doenças estão associadas à ação destas espécies reativas de oxigênio com moléculas biológicas, tais como diabetes, catarata, síndrome de Parkinson e a própria insuficiência cardíaca (Yu 1994; Carrol et al., 1987).

Na tentativa de minimizar ou até mesmo inibir os efeitos deletérios das ERO, nosso organismo possui um complexo e bastante eficiente sistema de defesa antioxidante. Este sistema é

composto de elementos enzimáticos e não-enzimáticos (Ferreira e Matsubara, 1997).

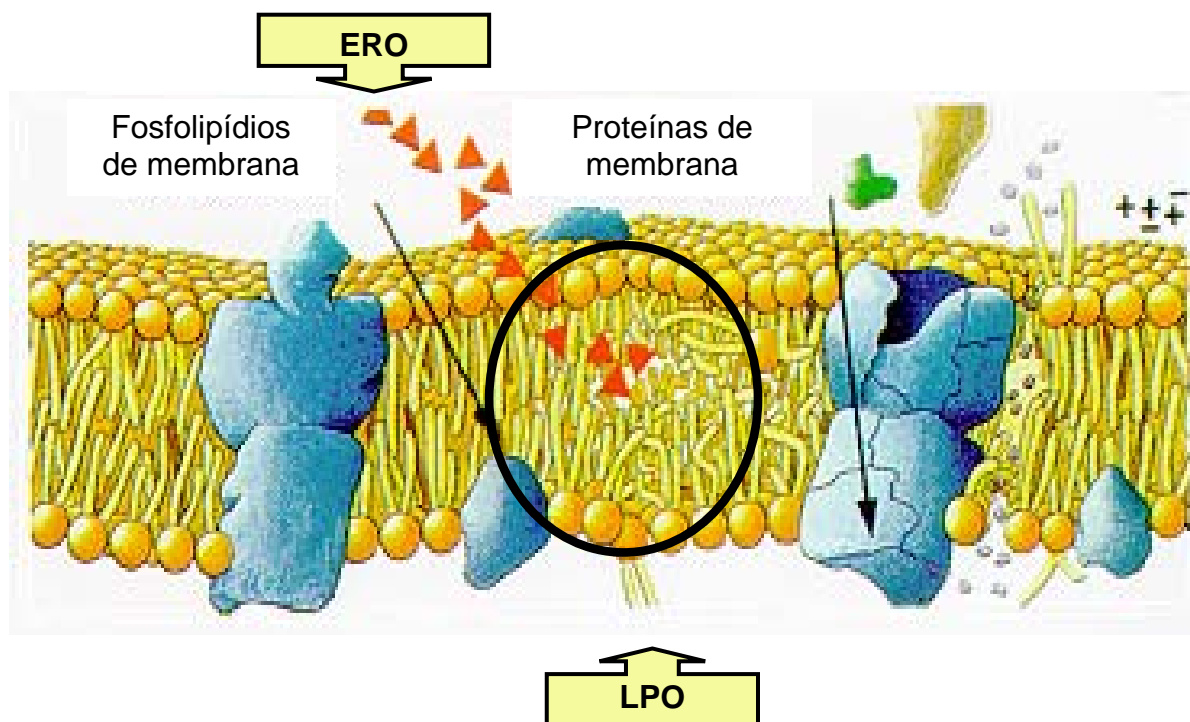


Figura 1.4: danos aos lipídios de membrana (LPO) causado pela ação das espécies reativas de oxigênio (ERO).

Dentre os compostos não-enzimáticos, destacam-se os tocoferóis, sendo o *α-tocoferol* o tipo mais comum deste elemento consumido na dieta. Sua eficiência reside no fato de ter a capacidade de inibir reações desencadeadas pela LPO por sua inserção nas membranas celulares. A *vitamina C* (ácido ascórbico), um potente antioxidante amplamente consumido pela população, desempenha um papel muito importante em processos de regeneração do *α-tocoferol*. O *β-caroteno*, precursor da vitamina A, e o tripeptídeo *glutathione*, presente em grandes concentrações na maioria das células eucariontes, somam-se às demais vitaminas citadas, na constituição do nosso sistema de defesa antioxidante não-enzimática (Yu, 1994; Ferreira e Matsubara, 1997; Singal et al., 2000).

Os principais elementos constituintes do sistema de defesa

antioxidante enzimático são:

1. Superóxido dismutase (SOD), que atua como primeira linha de defesa antioxidante. Sua função é dismutar o radical superóxido  $O_2^{\bullet -}$  (ERO gerada no primeiro passo do processo de redução monovalente do oxigênio até peróxido de hidrogênio);
2. Catalase (CAT), responsável por dissociar o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) à água. O peróxido de hidrogênio não é considerado um radical livre por não possuir elétrons desemparelhados no seu orbital mais energético, mas é considerado uma ERO, pois, quando na presença de metais de transição como o ferro e o cobre, pode dar origem ao radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), um dos radicais mais agressivos a sistemas biológicos;
3. Glutathione peroxidase (GPx), assim como a catalase, catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e também hidroperóxidos orgânicos à água ou álcool, respectivamente. A diferença entre estas duas enzimas é que a GPx é mais efetiva em baixas concentrações de  $H_2O_2$  da ordem de nM enquanto a ação da CAT se encontra mais ativa com concentrações da ordem de mM de  $H_2O_2$  (Tsutsui et al., 2001; Singal et al., 1999).

O estresse oxidativo é definido como um estado de desequilíbrio no balanço entre a formação de oxidantes e a capacidade de atuação do sistema antioxidante em favor dos primeiros. É sugerido que o estresse oxidativo esteja envolvido no quadro de transição da hipertrofia compensada para a insuficiência cardíaca (Singal et al., 1999, 2000).

### 1.4 Hipertrofia Cardíaca

O pleno desenvolvimento da atividade cardíaca depende de uma delicada e complexa interação que envolve dentre outros, elementos do sistema neuroendócrino, sinalizadores celulares para transcrição gênica e componentes funcionais do músculo cardíaco. Neste sentido, a estrutura do miocárdio desempenha um papel fundamental no trabalho eficiente deste órgão. O formato do miócito cardíaco depende da composição interna da célula e de sua capacidade de interação com o meio externo. Uma característica intrínseca de todas as células é a sua capacidade de modificar seu funcionamento em resposta a estímulos externos. Deste modo, alterações extracelulares percebidas pelo miocárdio são capazes de promover modificações tanto bioquímicas e eletrofisiológicas quanto estruturais do mesmo. Dependendo do tipo e do tempo de duração destes estímulos, as modificações adaptativas apresentadas pela célula cardíaca alteram suas características funcionais.

Durante seu desenvolvimento, o miócito cardíaco passa por várias modificações e, na fase adulta, pode ser alterado em resposta a quadros de determinadas doenças. A hipertrofia do miocárdio é provavelmente o melhor exemplo de adaptação de uma estrutura celular à estimulação (Terracio e Thomas, 1998).

A hipertrofia cardíaca pode ser classificada como fisiológica (ex: induzida pelo exercício) ou patológica (resposta à sobrecarga crônica de volume e/ou pressão) (Wakatsuki et al., 2004). A manifestação patológica representa uma fase de reestruturação do tecido cardíaco com a finalidade de compensar uma diminuição da função de bombeamento. Este processo é transitório e invariavelmente evolui para estágios mais avançados nos quais, mesmo hipertrofiado, o coração torna-se progressivamente incapaz de manter um funcionamento adequado. A longo prazo, estas alterações estruturais do miócito cardíaco são novamente

modificadas, ocorrendo diminuição de tecido contrátil e deposição de tecido fibroso. Este novo arranjo celular promove uma diminuição da capacidade contrátil do coração e a instalação de um quadro de insuficiência cardíaca (incapacidade do coração em manter a eficiência de seu trabalho em níveis que permitam a integridade de todo o sistema) (Singal et al., 1999; Tombe, 1998).

Uma das características do desenvolvimento do processo de insuficiência cardíaca é um aumento gradual da pressão diastólica final e diminuição da pressão sistólica ventricular final. Na tentativa de compensar estes declínios na função de bombeamento, vários mecanismos são deflagrados, dentre estes, o que controla a resposta de remodelamento do miócito cardíaco é o mais amplamente conhecido (Tombe, 1998).

### **1.5 Estresse Oxidativo e Insuficiência Cardíaca**

Embora a causa exata da insuficiência cardíaca não tenha sido completamente elucidada, devido aos múltiplos fatores envolvidos no seu desencadeamento, vários estudos apontam para a participação de radicais livres e em especial das ERO na patogênese desta doença (Halliwell, 2000; Yu, 1994; Darley-Usmar e Halliwell, 1996, Khaper et al., 1999).

Em sua revisão, Antozzi e Zeviani (1997) descrevem a importância das bases moleculares e bioquímicas para o entendimento de cardiomiopatias primárias e as subdividem em dois grupos: 1) como resposta a desordens da contratilidade do miocárdio e de proteínas contráteis e 2) como desordens no metabolismo energético cardíaco, sendo os defeitos nos processos de fosforilação oxidativa na mitocôndria e no processo de beta oxidação, reconhecidamente as principais causas metabólicas da cardiomiopatia. Devido a estas alterações metabólicas, é possível inferir as conseqüentes alterações nos processos de oxi-redução que ocorrem na célula, e conseqüentemente no *status* de estresse oxidativo ao qual este órgão está submetido.



Tsutsui et al. (2001), analisando miócitos cardíacos isolados de cães com insuficiência cardíaca induzida, encontraram que estes apresentavam maior susceptibilidade a lesões celulares induzidas por estresse oxidativo, quando comparados com seus controles. Singal et al. (2000) descrevem a possível participação das ERO e o comportamento do sistema de defesa antioxidante no processo de insuficiência cardíaca congestiva, concluindo a evidente participação destas espécies nesta síndrome. Os autores sugerem ainda, que a partir destes dados, novas estratégias de tratamento com elementos antioxidantes devam ser propostas.

### 1.6 Exercício, Estresse Oxidativo e Insuficiência Cardíaca

O relatório que apresenta o posicionamento da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Federação Internacional de Medicina do Esporte (FIMS), com relação ao “exercício para a saúde”, descreve um panorama comportamental de nossa sociedade, no que diz respeito à atividade física e sua relação com doenças, sendo aspectos a destacar:

- ↳ metade da população mundial é insuficientemente ativa;
- ↳ homens sedentários têm risco de desenvolver doenças coronarianas duas vezes maior do que os fisicamente ativos;
- ↳ a atividade física aumenta a longevidade e protege contra o desenvolvimento das principais doenças crônicas não transmissíveis, como a doença arterial coronariana, hipertensão arterial, acidente vascular encefálico, *diabetes mellitus* não insulino dependente, osteoporose e neoplasias de cólon;
- ↳ crianças, adolescentes e adultos devem ser estimulados à prática da atividade física e em especial os indivíduos da terceira idade com a finalidade de manter sua independência de movimentação e autonomia pessoal.

Também em relação à associação do exercício com qualidade de vida e com base nos riscos e benefícios documentados do exercício físico para pacientes com doença arterial coronariana, é posicionamento oficial do *American College of Sports Medicine*, que a maior parte dos pacientes coronariopatas deve participar de um programa de exercícios individualmente prescritos para atingir uma saúde ideal dos pontos de vista físico e emocional (ACSM, 1998). Além disso, segundo a Associação Americana do Coração, a prática de exercícios orientados e regulares por indivíduos com insuficiência cardíaca, parece ser segura e benéfica.

Até alguns anos atrás, os indivíduos cardiopatas eram aconselhados a evitarem o esforço físico em função de que esta prática poderia acelerar o processo de evolução da doença. Com o passar do tempo, estudos começaram a demonstrar que a incapacidade de execução do exercício não estava somente relacionada ao grau de disfunção ventricular sistólica e que, adicionalmente, alterações estruturais e metabólicas do miocárdio contribuíam para o desenvolvimento dos sintomas da limitação funcional e do aparecimento de demais eventos clínicos adversos (McKelvie et al., 1995). Deste modo, atualmente, a inatividade física em portadores de doenças cardiovasculares não é só desnecessária como também indesejável, sendo que no ambiente clínico, o exercício físico se tornou uma ferramenta extremamente útil tanto para diagnóstico como uma das principais prescrições não farmacológicas na rotina terapêutica. Dois estudos se destacam neste contexto, Belardinelli e colaboradores (1999), desenvolveram o primeiro ensaio clínico prospectivo de longa duração, randomizado e controlado de treinamento físico em pacientes portadores de insuficiência cardíaca congestiva. Os resultados deste estudo demonstraram que o programa físico promoveu um aumento no pico de consumo máximo de oxigênio, diminuição na readmissão hospitalar, melhora da qualidade de vida e estava associado a uma diminuição na mortalidade destes indivíduos. A partir destes dados, Georgiou e colaboradores

(2001), estabeleceram o custo financeiro efetivo individual dos pacientes que participaram do programa de treinamento físico em relação aos insuficientes sedentários, constatando uma significativa diminuição dos custos além de um aumento na expectativa de vida nos indivíduos exercitados.

Todos estes benefícios gerados pelo exercício se desenvolvem através da exposição contínua do indivíduo a esta atividade (treinamento). Deve-se observar, que para populações especiais, como pacientes com insuficiência cardíaca, as manifestações clínicas devem ser observadas com rigor quando do planejamento de um programa de exercícios, para que este não ofereça riscos aos seus participantes (Meyer, 2001). Portadores de IC apresentam capacidade de bombeamento cardíaco reduzida (fração de ejeção é em geral  $< 35\%$ ), frequência cardíaca máxima reduzida e sistema nervoso simpático hiperativo. Além disso, estes pacientes apresentam sinais de fadiga precoce durante o esforço até mesmo de ligeiro a moderado, possuindo um consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$  máx.) bastante limitado. Estes indivíduos possuem uma estimativa de vida de 5 anos após o diagnóstico desta doença, apresentando como primeiro sintoma fadiga precoce e, conseqüentemente, intolerância ao exercício, tornando limitada a execução de atividades da vida diária e, deste modo, diminuição da qualidade de vida dos mesmos.

A capacidade limitada de execução de exercícios, caracterizada pela fadiga precoce, apresentada por indivíduos cardiopatas é também explicada pelas alterações metabólicas musculares desenvolvidas por estes pacientes. Sullivan et al. (1991) descrevem importantes diferenças na resposta metabólica da musculatura esquelética entre pacientes com insuficiência cardíaca crônica e normais, quando submetidos a exercício sub-máximo e máximo. Seus resultados demonstram que a atividade de enzimas da rota de fornecimento de energia aeróbia na musculatura esquelética é inversamente relacionada à acumulação do lactato sanguíneo durante exercícios sub-máximos. Estes dados

dão suporte à concepção de que a atividade reduzida destas enzimas na musculatura esquelética desempenha um papel importante na resposta metabólica de pacientes com insuficiência cardíaca crônica submetidos ao exercício (Sullivan et al., 1991). Além disso, uma prejudicada dilatação endotélio-dependente dos vasos de resistência, é observada em quadros de insuficiência cardíaca, o que também contribui para intolerância ao exercício apresentada nesta doença. Esta ineficiente vasodilatação pode ser simplesmente decorrente da diminuição do óxido nítrico (NO), como também da interação de outros fatores como das ERO ou liberação de prostanóides. Varin et al. (1999) analisando ratos submetidos à insuficiência cardíaca por ligadura da artéria coronária e, posteriormente, submetidos a dez semanas de natação, descreveram que o exercício restaura parcialmente a dilatação mediada por fluxo de pequenas artérias através de um incremento na expressão da eNOS e prevenção da produção de vasoconstritores prostanóides e de radicais livres. A partir de seus resultados, os autores concluíram que esta restauração da dilatação mediada por fluxo deva contribuir para um aumento na capacidade de execução de exercício em situações de insuficiência cardíaca crônica.

A relação do exercício com o estresse oxidativo é largamente descrita na literatura. Durante o exercício, a taxa de consumo de oxigênio aumenta significativamente em relação ao repouso (Grass, 2000).

Embora provoque um aumento no metabolismo celular e, muitas vezes, seja reconhecido como um fator de estresse para o organismo, quando executado em uma intensidade e frequência adequada a cada indivíduo, o exercício pode induzir adaptações do sistema de defesa enzimático antioxidante, evitando deste modo possíveis danos decorrentes deste processo (Souza-Rabbo et al., 2003). Estas adaptações geradas pelo treinamento físico podem ser benéficas ao indivíduo, mesmo em situações que não envolvam o exercício.

A partir dos dados apresentados, fica evidente a inter-relação da tríade insuficiência cardíaca, estresse oxidativo e exercício. Apesar dos constantes avanços de áreas afins nas descobertas de novos métodos de diagnóstico, medicamentos de última geração e de terapias não farmacológicas alternativas com relação ao combate às causas e conseqüências da insuficiência cardíaca (em qualquer nível de sua manifestação), a mortalidade decorrente desta doença ainda permanece elevada. Deste modo, faz-se necessária uma incessante procura de subsídios, através de estudos, para o desenvolvimento de terapias mais eficientes no sentido não só da manutenção da qualidade vida, como também da longevidade de indivíduos portadores desta doença.

### **1.7 Hipótese**

O presente estudo foi elaborado com a intenção de testar a hipótese de que os animais submetidos a um programa de exercícios físicos melhoram o quadro de hipertrofia de ventrículo direito e insuficiência cardíaca induzidos pela droga monocrotalina, através da modulação tanto de respostas hemodinâmicas quanto de marcadores de estresse oxidativo.

## 1.8 Objetivos

### 1.8.1 Objetivo Geral

Em ratos Wistar, testar o efeito do treinamento físico no quadro de *Cor pulmonale* induzido por monocrotalina em três tempos distintos de tratamento, através da avaliação de parâmetros hemodinâmicos, estruturais e de estresse oxidativo.

### 1.8.2 Objetivos Específicos

Este estudo teve por objetivo, nos distintos grupos experimentais de animais tratados com monocrotalina por três, quatro e cinco semanas, assim como nos seus respectivos controles:

- a) avaliar a evolução do peso corporal dos animais;
- b) quantificar o grau de congestão dos pulmões e fígado;
- c) quantificar o grau de hipertrofia do ventrículo direito, esquerdo e cardíaca;
- d) avaliar o perfil hemodinâmico, através das medidas de pressão ventricular sistólica e diastólica final do ventrículo direito;
- e) avaliar o índice de contratilidade e relaxamento do ventrículo direito ( $\pm dP/dt$ );
- f) analisar a lipoperoxidação, através das técnicas de quimiluminescência (QL) em eritrócitos e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em tecido cardíaco;
- g) quantificar o potencial total antioxidante (TRAP) no plasma;
- h) verificar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione transferase (GST) e catalase (CAT), em tecido cardíaco e eritrócitos.

## **2 MATERIAIS e MÉTODOS**

### **2.1 Animais**

Foram utilizados 96 ratos machos Wistar pesando aproximadamente 180 g adquiridos do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em caixas plásticas com medidas de 270 x 260 x 310 mm, sendo quatro animais por caixa. Todos os animais permaneceram em ambiente com temperatura controlada (21°C) e ciclo “claro-escuro” de 12 horas e umidade relativa de 70%. Água e ração comercial foram oferecidas *ad libitum*. A evolução do peso foi aferida semanalmente.

Todos os procedimentos com os animais estavam 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 e Raymundo, 1997).

### **2.2 Grupos Experimentais**

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

1. Grupo controle sedentário (CS) → sem monocrotalina, não submetido ao protocolo de treinamento físico;
2. Grupo monocrotalina sedentário (MS) → com monocrotalina, não submetido ao protocolo de treinamento físico;
3. Grupo controle treinado (CT) → sem monocrotalina, submetido ao protocolo de treinamento físico;
4. Grupo monocrotalina treinado (MT) → com monocrotalina, submetido ao protocolo de treinamento físico.



### 2.3 Protocolo Experimental

A partir do 30º dia após o nascimento, os animais dos grupos treinados passaram por um período de adaptação ao exercício que constituiu de duas semanas de corrida em esteira rolante adaptada. Imediatamente após o término deste período (com os animais pesando aproximadamente 180g), foi injetada a droga monocrotalina (dose única, 60mg/kg i.p.) sendo que os animais controles receberam solução salina no mesmo volume e via de administração. Após 48 horas, iniciou-se o protocolo de treinamento que teve a duração de três, quatro e cinco semanas. Durante as sessões de exercícios os animais dos grupos SC e MC, permaneceram próximos à esteira rolante e foram manipulados com a finalidade de sofrerem estresse semelhante aos animais submetidos ao exercício. Vinte e quatro horas após a última sessão de exercício (na 3ª, 4ª e 5ª semanas), os animais foram anestesiados e canulados para que fossem feitos os registros hemodinâmicos. Após o procedimento de registro, os animais foram mortos por deslocamento cervical.

### 2.4 Protocolo de Treinamento

O protocolo de treinamento constituiu de sessões de corrida em esteira ergométrica adaptada (Figura 2.1) (modelo TK 01, IMBRAMED) segundo protocolo pré-estabelecido (Tabela 1), cinco vezes por semana, durante três, quatro e cinco semanas. Os animais foram mortos individualmente por deslocamento cervical, 24 horas após a última sessão de exercício ao término do protocolo (incluindo o grupo controle).



Figura 2.1: animais executando uma sessão do protocolo de treinamento físico.

Tabela 2.1: Protocolo de Treinamento Físico. Frequência: 5 x por semana.

Semana	Período de adaptação		Período de treinamento	
	Tempo (min)	Velocidade máx. (Km/h)	Tempo (min)	Velocidade máx. (Km/h)
1 <sup>a</sup>	45	0.6	-	-
2 <sup>a</sup> *	60	0.9	-	-
1 <sup>a</sup>	-	-	60	0.9 /0.7
2 <sup>a</sup>	-	-	50	0.6
3 <sup>a</sup>	-	-	50	0.6
4 <sup>a</sup>	-	-	50	0.6
5 <sup>a</sup>	-	-	50	0.6

(\*) Injeção de monocrotalina ou solução salina.

## **2.5 Indução de Hipertensão Pulmonar e Insuficiência Cardíaca**

Para indução de hipertensão pulmonar e insuficiência cardíaca foi aplicada uma injeção intraperitoneal única para cada animal (60mg/Kg) da droga Monocrotalina (Crotaline – C240 SIGMA) (Werchan et al., 1989). A crotalina é um alcalóide de origem vegetal sendo um potente agente carcinogênico. Seu metabolismo hepático gera dehidromonocrotalina (MCTD), um metabólito reativo que é subsequente transportado até os pulmões, sendo capaz de induzir uma resposta citotóxica resultando em hipertensão pulmonar. Os animais do grupo controle e grupo treinado receberam uma injeção com mesmo volume de solução salina nas mesmas condições.

## **2.6 Avaliação Hemodinâmica**

Para a avaliação de parâmetros hemodinâmicos, os animais foram anestesiados com quetamina (60mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg) administradas intraperitonealmente. A veia jugular direita foi exposta e uma cânula (catéter de polietileno PE-50) foi implantada e introduzida até o átrio e ventrículo direito. A pressão sistólica ventricular direita (PSVD) e a pressão diastólica final ventricular direita (PDFVD) foram monitoradas usando um transdutor de pressão (Strain-Gauge – Narco Biosystem Miniature Pulse Transducer RP-155, Houston, Texas, USA) ligado a um amplificador de sinais (pressure Amplifer HP 8805C). Os sinais analógicos de PA foram digitalizados (CODAS – Data Acquisition System, PC) com frequência de amostragem de 2000 Hz, expressos em mmHg.

## **2.7 Análise da Derivada de Contração e Relaxamento do Ventrículo Direito**

A análise foi feita utilizando-se programa comercial associado ao sistema de aquisição. Este programa permite a derivação da onda de pressão ventricular direita e detecção de máximos e mínimos destas curvas batimento a batimento, fornecendo os valores das derivadas de contração (+ dP/dt) e de relaxamento (- dP/dt). Dados expressos em mmHg/s.

## **2.8 Hipertrofia Cardíaca**

Imediatamente após os animais serem mortos, os corações foram retirados sendo primeiramente pesados integralmente e logo após, os ventrículos direito e esquerdo mais o septo, foram pesados separadamente. A hipertrofia cardíaca foi avaliada através da razão do peso do coração isolado pelo peso corporal, expressada em g/mg.

## **2.9 Nível de Congestão Hepática e Pulmonar**

Imediatamente após a morte dos animais, fígado e pulmão foram extraídos, pesados e posteriormente submetidos a processo de secagem em estufa (65°C por 48h) e novamente pesados. O nível de congestão hepática e pulmonar foi avaliado a partir da razão do peso dos órgãos úmidos/secos e expresso em g/g.

## **2.10 Preparação do Tecido**

O coração foi imediatamente retirado, pesado e homogeneizado em ultra-Turrax em cloreto de potássio (KCl) 1,15% (5mL por g de tecido para coração e 9mL por g de tecido para fígado), fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) na concentração de 100mM em isopropanol e na quantidade de 10 $\mu$ l

por mL de KCl adicionado. A suspensão foi centrifugada a 3000rpm por 10min em centrífuga refrigerada (Sorvall RC %B – SM 24), à 0-4°, para remoção dos núcleos e fragmentos de células (Llesuy et al.1985). O sobrenadante foi aspirado, separado em alíquotas e congelado em freezer (-70°C), sendo utilizado posteriormente para as análises da atividade das enzimas antioxidantes e da lipoperoxidação.

### 2.11 Preparação do Sangue

Imediatamente após o registro de pressão, realizou-se a coleta de 1,5mL de sangue, através de punção do plexo venoso retro-orbital com um capilar de vidro com uma das extremidades quebrada em bisel (Halpern & Pacaud, 1951). Para isso, os animais foram previamente anestesiados com quetamina (90mg/Kg de peso corporal) e xilazina (10mg/Kg de peso corporal). O sangue coletado foi centrifugado por 10 minutos a 1000 x g em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24). Os eritrócitos foram lavados com soro fisiológico (NaCl 0,9%) por três vezes e aliquotados para a medida de lipoperoxidação. Para isso, os eritrócitos foram ressuspensos em soro fisiológico (NaCl 0,9%) e analisados imediatamente. Para a verificação da atividade e das enzimas antioxidantes foi adicionado aos eritrócitos solução de ácido acético 1mM e sulfato de magnésio 4mM, para poderem ser armazenados em freezer a -80°C.

### 2.12 Quantificação de Proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores (1951), que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL. Reagentes utilizados: Reativo de Folin Ciocalteau, diluído em água destilada na proporção de 1:3, e Reativo C, que é composto por 50mL do reativo A, 0,5mL do reativo B1 e 0,5mL do reativo B2,

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

### 2.13 Dosagem de Hemoglobina

A hemoglobina foi dosada nas amostras de eritrócito diluído em soro fisiológico. Esta análise foi feita utilizando-se uma mistura de cianetos para se obter o reativo de Drabkin, este reativo reage com a hemoglobina formando cianometahemoglobina, que foi medida, em espectrofotômetro a 546 nm e os resultados expressos em mg/mL segundo Drabkin & Austin, 1935.

### 2.14 Quimiluminescência (QL)

O método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética ao homogeneizado de tecido, avaliando-se a capacidade de resposta produzida pela amostra. A realização deste tipo de teste consiste no fato de que os hidroperóxidos são espécies químicas bastante instáveis, reagindo com lipídios por um mecanismo radicalar que gera produtos que emitem luz pela amostra em estudo. A quimiluminescência (QL) foi medida em contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer). O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistiu em 3,5mL de uma solução reguladora de KCl 140mM, fosfatos 20mM, (pH 7,4), na qual foi adicionado 0,5mL de amostra. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps), por miligrama de proteína segundo Gonzalez-Flecha e colaboradores (1991).

### 2.15 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A técnica consiste em aquecer o material biológico a ser testado na presença de ácido tiobarbitúrico, para medir espectrofotometricamente a formação de um produto de coloração rósea. Para tanto, foi utilizada uma alíquota de 0,25 mL de homogeneizado, à qual foram adicionados 0,75 mL de ácido tricloroacético a 10%, que tem a função de desnaturar as proteínas presentes e acidificar o meio de reação. Esta mistura foi, então, agitada e centrifugada durante 3 minutos a 1000 g. Foram retirados 0,5 mL do sobrenadante e a este foram adicionados 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67%, que reage com os produtos da lipoperoxidação formando um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada por 15 minutos a 100°C e resfriada. Em seguida, realizada a leitura da absorbância a 535nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em nmoles de TBA-RS por mg de proteína, segundo Buege & Aust, (1978).

### 2.16 Superóxido Dismutase (SOD)

A técnica que foi utilizada neste trabalho para determinação da SOD está baseada na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Dado que não se pode determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, utilizou-se a quantificação em unidades relativas. A oxidação do pirogalol foi detectada espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD foi determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado. No meio de reação, foram utilizados 973 µL de tampão Tris 50 mM (pH 8,2), 8 µL de pirogalol 24 mM, 4 µL de catalase 30

$\mu\text{M}$ . O aumento na absorvância foi acompanhado durante 2 minutos a 420 nm, sendo esta curva utilizada como branco. Foi feita uma curva padrão utilizando três concentrações distintas (0,25U, 0,5U e 1U) de SOD (Sigma Biochemical St. Louis, USA) através da qual foi obtida a equação da reta para realização dos cálculos. Os resultados foram expressos em U SOD/mg proteína, segundo Marklund, 1985.

### 2.17 Glutathione Peroxidase (GPx)

A enzima glutathione peroxidase (GPx) catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutathione reduzida (GSH) para formar glutathione oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido. Logo, sua atividade pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação da GPx.

A amostra foi previamente preparada adicionando-se uma mistura de cianetos para inibir a atividade pseudo-peroxidase da hemoglobina, transformando-a em cianometahemoglobina. Mediu-se então, a atividade da glutathione peroxidase em espectrofotômetro a 340nm, em um meio de reação que continha: solução tampão fosfato 140 mM e EDTA 1mM, (pH 7,5;), NADPH 0,24 mM; azida sódica 1mM, utilizada para inibir a atividade da catalase; GSH 5 mM; glutathione reductase (GR) 0,25 U/mL e, por fim, hidroperóxido de tert- butila 0,5 mM.

Na cubeta, foram adicionados 330 $\mu\text{L}$  de tampão, 50 $\mu\text{L}$  de amostra, 500 $\mu\text{L}$  de NADPH, 10 $\mu\text{L}$  de azida sódica, 50 $\mu\text{L}$  de GSH e 10 $\mu\text{L}$  de GR. A absorvância foi registrada por aproximadamente 3 minutos. Adiciona-se 50 $\mu\text{L}$  de hidroperóxido de tert-butila e a diminuição da absorvância, devido ao consumo de NADPH, foi monitorada por um tempo médio de 5 minutos. Os resultados foram expressos em nmoles por minuto por mg de proteína segundo Flohé & Gunzler, 1984.



### **2.18 Catalase (CAT)**

A atividade da catalase é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio e obedece a uma cinética de pseudoprimeira ordem. Sendo assim, sua atividade pode ser medida através da avaliação do consumo do  $H_2O_2$ .

Este teste consiste em avaliar a diminuição da absorvância no comprimento de onda de 240nm, que é onde ocorre maior absorção pelo peróxido de hidrogênio. Para a realização deste ensaio foram utilizados uma solução tampão fosfato a 50mM (pH=7,4) e peróxido de hidrogênio 0,3M.

Em cubeta de quartzo, foram adicionados 955 $\mu$ L do tampão fosfato e 10 $\mu$ L de amostra. A cubeta foi colocada no espectrofotômetro e descontada contra um branco de tampão fosfato. Após, foram adicionados 35 $\mu$ L do  $H_2O_2$  e foi feito o monitoramento da diminuição da absorvância a 240 nm. Os resultados foram expressos em picomoles por miligramas de proteína, segundo Boveris & Chance, 1973.

### **2.19 Glutathione S-transferase (GST)**

As glutathione transferases são um grupo de enzimas que catalisam reações de conjugação de glutathione com vários xenobióticos, tendo um importante papel na detoxificação de agentes alquilantes. Todas as transferases são ativas com o composto 1 cloro-2,4dinitro benzeno (CDNB), sendo a conjugação deste com GSH utilizada para quantificar-se sua atividade. A formação do composto corado dinitro-fenil-glutathione (DNP-SG), foi medida espectrofotometricamente a 340nm. Para realização deste ensaio foram utilizados 850 $\mu$ L de solução tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH = 6,5), 50 $\mu$ L de GSH, 50 $\mu$ L de amostra e 150 $\mu$ L de

CDNB (20mM). A atividade da GST foi expressa em nmoles/min/mg de proteína. (Mannervik, & Gluthemberg, 1981).

## **2.20 Análise Estatística**

Com base nos resultados das análises, foram calculadas as médias e os erros padrões da média para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. Para a comparação entre os grupos foi aplicada análise de variância (ANOVA) de uma via, complementado com o teste de Student-Newmann-Keuls.

As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou  $p < 0,05$ . O software GraphPad Instat, versão 3.00 para Windows 95, foi utilizado como ferramenta computacional para análise estatística dos dados.

### 3 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo foram descritos em forma de artigos e subdivididos de maneira que fossem submetidos a três revistas indexadas com fator de impacto acima de 1,0. Neste capítulo tais resultados serão apresentados segundo o quadro abaixo:

Título do artigo	Resultados	Periódico
“Peripheral Markers of Oxidative Stress and Hemodynamic Assessment in Chronically Exercised Rats Treated With Monocrotaline.”	<p><b>Tempo pós-tratamento:</b> 3 semanas.</p> <p><b>Amostra:</b> sangue</p> <p><b>Hemodinâmica:</b> PSVD, PDFVD, <math>\pm</math> dP/dt.</p> <p><b>Morfometria:</b> VD, pulmão e fígado,</p> <p><b>Estresse oxidativo:</b> QL, SOD,CAT, GPx,GST</p>	<p><i>Canadian Journal of Applied Physiology</i></p> <p>(submetido)</p>
“Effects of Exercise Training on Hemodynamic and Oxidative Stress in experimental <i>Cor pulmonale</i> .”	<p><b>Tempo pós-tratamento:</b> 4 e 5 semanas.</p> <p><b>Amostra:</b> sangue</p> <p><b>Hemodinâmica:</b> PSVD, PDFVD, <math>\pm</math> dP/dt.</p> <p><b>Morfometria:</b> VD, pulmão e fígado,</p> <p><b>Estresse oxidativo:</b> QL, SOD,CAT, GPx,GST</p>	<p><i>Acta Physiologica Scandinavica.</i></p> <p>(submetido)</p>
“Myocardial oxidative stress in monocrotaline-treated rats submitted to exercise training”.	<p><b>Tempo pós-tratamento:</b> 3, 4 e 5 semanas.</p> <p><b>Amostra:</b> tecido cardíaco</p> <p><b>Estresse oxidativo:</b> TBA, TRAP, SOD,CAT, GPx,GST</p>	<p><i>Process Biochemistry</i></p> <p>(em fase de submissão)</p>

Além destes, os dados referentes ao desenvolvimento corporal serão demonstrados a seguir (Figura 5), pois os mesmos

não foram apresentados em nenhum dos estudos acima citados. Será, também, fornecida uma compilação dos principais resultados sob a forma de um *marcador de página*, com a finalidade de facilitar o acesso aos mesmos, quando da avaliação do trabalho. Apesar de os grupos experimentais apresentarem nomenclatura diferenciada nos distintos artigos, neste encarte os mesmos seguirão a nomenclatura indicada no capítulo de materiais e métodos desta tese.

Convém ressaltar, que no primeiro estudo apresentado com dados relativos à terceira semana de tratamento, não foram apresentados os dados dos animais controle treinados (CT), em função de que, neste período, houve uma expressiva perda de amostra deste grupo durante o desenvolvimento de determinados protocolos experimentais.

### **3.1 Resultados Referentes à Evolução do Peso Corporal dos Distintos Grupos Experimentais nos Diferentes Tempos de Tratamento**

Os dados referentes ao ganho de peso dos animais durante a aplicação do protocolo experimental são apresentados na figura 3.1. Não houve diferença significativa com relação ao peso dos animais nos distintos grupos experimentais tanto antes do início quanto na primeira semana de tratamento. Na segunda semana, os animais dos grupos MS e MT apresentaram diminuição significativa quando comparados aos seus controles, CS (30%) e CT (14%) respectivamente, sendo que os animais do grupo CT mostraram valores menores do que os do grupo CS (10%). Na terceira semana, os animais tratados com MCT apresentaram uma diminuição significativa no ganho de peso quando comparados aos seus controles na ordem de 80% (CS) e 77% (CT) respectivamente. Na quarta semana os animais dos grupos MS e MT mantiveram um menor ganho de peso quando comparados com

seus respectivos controles, CS (10%) e CT (14%). Não houve diferença significativa neste parâmetro na quinta semana de tratamento.

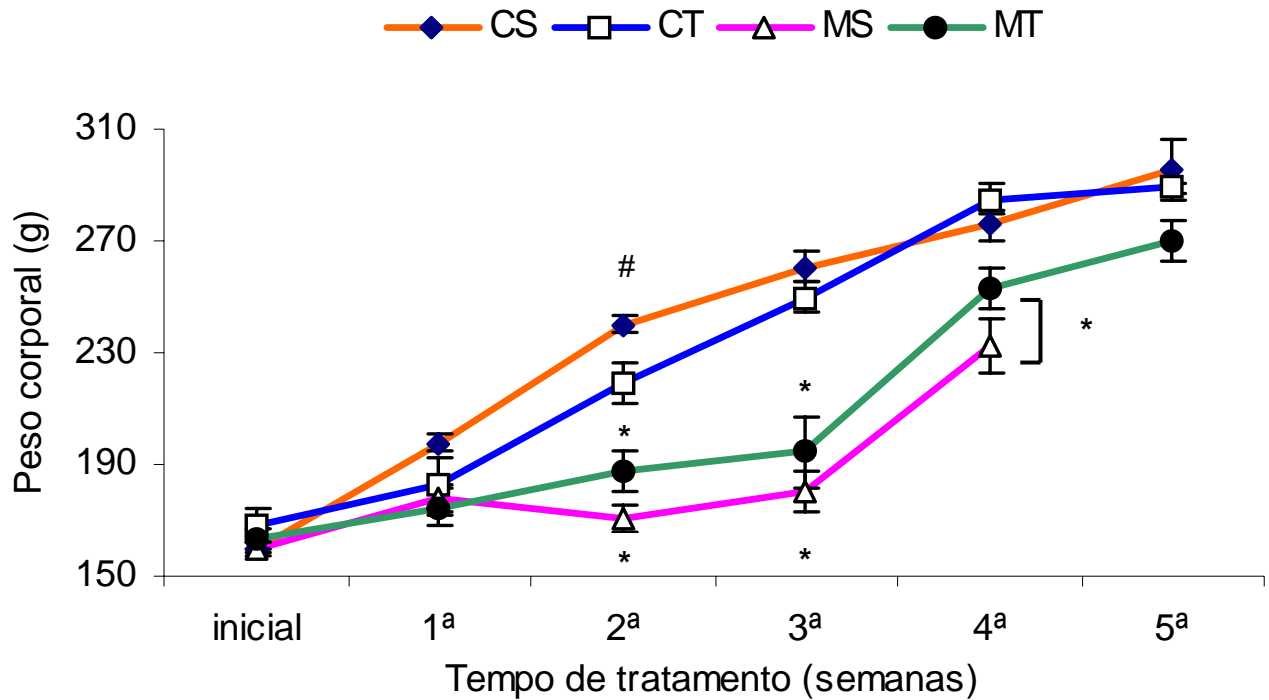


Figura 3.1: Evolução do peso corporal durante o período experimental, para uma amostra de 8 animais por grupo.

(\*) significativamente diferente de CS e CT ( $P < 0,05$ );

(#) significativamente diferente de CT ( $P < 0,05$ ).

## 4 DISCUSSÃO

Uma discussão mais detalhada com relação aos diferentes tempos de tratamento e os diferentes tipos de tecidos é apresentada individualmente em cada artigo anexado no capítulo de resultados. Deste modo, procuraremos abordar de forma mais abrangente o conjunto de dados obtidos, visando, no entanto, manter uma linha de raciocínio que favoreça a compreensão de nossos resultados.

### 4.1 Dados Morfométricos

#### 4.1.1 Desenvolvimento Corporal, Pulmão e Fígado

Desde a década de 1960, quando os mecanismos da toxicidade dos alcalóides pirróis começaram a ser observados e, a partir da descrição do metabolismo dos mesmos, a monocrotalina tem se destacado como modelo experimental de estudo da hipertensão pulmonar e *Cor pulmonale* (Kay et al., 1967; Mattocks, 1968; Thomas et al, 1998). O grau de dano ao sistema biológico induzido pela monocrotalina depende de alguns fatores como: espécie estudada, gênero, idade, dose, via de administração utilizada e tempo de duração do experimento. Apesar do grande número de publicações utilizando este modelo, não é de nosso conhecimento a existência de dados relacionando treinamento físico, estresse oxidativo e *Cor pulmonale*, até o momento na literatura.

Em nosso estudo, utilizando ratos Wistar machos pesando em torno de 180g, a administração de uma única injeção intraperitoneal na concentração de 60mg/kg de monocrotalina, foi capaz de induzir alterações tanto morfométricas quanto hemodinâmicas nos animais. Estes resultados corroboram estudos que demonstram que esta concentração possui a mesma eficiência

no desenvolvimento das manifestações de *Cor pulmonale* em relação à utilização de doses mais elevadas, com a vantagem de um índice de mortalidade dos animais significativamente menor (Werchan et al., 1989; Kasahara et al., 1997).

Os animais tratados com monocrotalina apresentaram um menor ganho de peso corporal em relação aos animais controles durante todo o período experimental. A perda de peso apresentada quando da utilização deste modelo é resultado da toxicidade gerada pelo metabolismo hepático nas primeiras semanas e, posteriormente, pela deterioração da capacidade ventilatória apresentada pelos animais (Mcnabb & Baldwin, 1984). De importante destaque é o fato de que, nas condições experimentais apresentadas em nosso estudo, na 5ª semana de tratamento não houve animais sobreviventes no grupo insuficiente sedentário. Como neste mesmo período a taxa de mortalidade nos animais do grupo insuficiente treinado foi de apenas 37%, podemos inferir a possibilidade de um papel protetor do exercício físico, sendo que os mecanismos propostos para tanto, serão discutidos posteriormente.

Outras alterações apresentadas pelos animais, já tradicionalmente bem descritas neste modelo, foram às modificações na coloração e arranjo da pelagem, dispnéia e secreção de vias aéreas. Em nosso estudo, apesar dos animais tratados com monocrotalina apresentarem dispnéia aparente a partir da terceira semana de tratamento, não houve diferença significativa nos índices de congestão pulmonar em nenhum intervalo de tempo nos animais tratados, quando foi utilizada a relação peso úmido pelo peso seco do órgão. Porém, quando estes resultados foram obtidos através da relação peso úmido pelo peso corporal total, os animais dos grupos monocrotalina sedentário e monocrotalina treinado, apresentaram congestão pulmonar somente na terceira semana após o tratamento. É possível que, neste intervalo de tempo, uma diminuição do ganho de peso (em função do tratamento) tenha ocorrido desproporcionalmente ao

aumento do peso dos órgãos contribuindo deste modo, para este resultado. Como citado anteriormente, os danos (tanto de tecido hepático quanto pulmonar) dependem de uma série de fatores que incluem até mesmo, a susceptibilidade individual do animal à droga. Este dado é evidente a partir de diversos resultados apresentados por diferentes autores. Farahmand e colaboradores (2004), demonstraram congestão pulmonar somente a partir da sexta semana de tratamento com monocrotalina. Entretanto, Brunner (1999) e Wölkart e colaboradores (2000) não observaram diferença no peso pulmonar tanto em animais com nove quanto com dez semanas de tratamento utilizando uma concentração de 50mg/kg i.p.

### **4.1.2 Hipertrofia de Ventrículo Direito**

Uma das principais características apresentadas pelo modelo com utilização da MCT é o desenvolvimento de hipertrofia compensatória seletiva do ventrículo direito já a partir da terceira semana de tratamento (Meyrick et al., 1980; Hill et al., 1989; Bernocchi et al., 1996; Farahmand et al., 2004). Em nosso estudo, na terceira semana de tratamento, os animais tratados com MCT e submetidos ao exercício físico não apresentaram hipertrofia ventricular direita quando comparados aos animais tratados sedentários. Estes resultados sugerem que o exercício, neste intervalo de tempo de tratamento, foi capaz de modular os mecanismos responsáveis pelo remodelamento cardíaco, em termos estruturais, muito embora estes dados não tenham se reproduzido na quarta e quinta semanas de tratamento. Apesar dos grandes avanços nas pesquisas na área da biologia molecular, o exato mecanismo que desencadeia o processo de hipertrofia do miócito cardíaco ainda não foi elucidado. Apesar disso, vários estudos apontam a cascata de reações que envolvem a participação da proteína MAPK como via de sinalização para o desenvolvimento de alterações estruturais do tecido cardíaco. A



MAPK (proteína quinase mitógeno-ativada) é uma proteína quinase (serina/treonina) que desempenha um papel importante na diferenciação, crescimento e apoptose celular, assim como na regulação da expressão de vários genes e fatores de transcrição. A MAPK é ativada pela fosforilação dos resíduos de treonina e tirosina e sua cascata de reações é uma rota de sinalização de transdução extremamente conservada, acoplando vários sinais extracelulares que induzem respostas intracelulares de adaptação (Nishida et al., 2004). As quinases ERK (quinase extracelular sinal-regulada), p38 e JNK (c-jun-NH<sub>2</sub>-terminal), são ativadoras da proteína MAPK e mostram-se ser ativadas por estiramento mecânico e pulsátil do miócito cardíaco, bem como por substâncias oxidantes como peróxido de hidrogênio e radical superóxido (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 (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. As diferenças nos mecanismos que distinguem a hipertrofia fisiológica (induzida pelo exercício) da patológica (por sobrecarga crônica de pressão e/ou ação de agonistas adrenérgicos) são sutis. Apesar de alguns aspectos como o desenvolvimento de fibrose e o declínio na contratilidade serem determinantes para a diferenciação, o exato estímulo e/ou local da rota na qual a sinalização celular é modificada, ainda são desconhecidos e precisam ser elucidados (Wakatsuki et al., 2004).

Não são encontrados na literatura dados referentes ao papel das MAPKs na insuficiência cardíaca direita associada ao exercício.

Vários estudos evidenciam que o estresse oxidativo e as MAPKs estão envolvidos na hipertrofia cardíaca em diferentes condições patológicas. Em recente revisão, Giordano (2005)

descreve as possíveis rotas que envolvem a participação das ERO no processo de sinalização para o desenvolvimento da hipertrofia.

### **4.2 Dados Hemodinâmicos**

#### **4.2.1 Pressões Diastólica e Sistólica Final de Ventrículo Direito**

A grande maioria dos estudos que utilizam a monocrotalina como modelo de insuficiência cardíaca apresentam alterações significativas nos resultados hemodinâmicos do ventrículo direito (Chesney et al., 1974; Schaible & Scheuer 1981; Meyrick et al., 1980). Em nosso estudo, os animais tratados com MCT apresentaram um significativo aumento nos valores do pico de pressão sistólica do ventrículo direito na terceira e quarta semanas de tratamento. Convém lembrar, que o foco inicial de atuação do metabólito ativo da MCT é o tecido pulmonar, induzindo lesão de endotélio principalmente do leito arterial pulmonar, resultando em desenvolvimento de hipertensão pulmonar. Como conseqüência, ocorre um aumento na pós-carga imposta ao ventrículo direito. Esta situação deflagra os mecanismos de hipertrofia do miócito cardíaco no sentido de compensar esta nova demanda contrátil. As pressões sistólicas elevadas são resultado deste processo de adaptação do tecido cardíaco no sentido de manutenção da capacidade funcional adequada do coração. Com relação à pressão diastólica, nossos resultados demonstraram que, na quarta semana, os animais exercitados tratados com MCT, apresentaram uma diminuição dos valores quando comparados aos seus controles, sendo que na quinta semana não houve diferenças entre os grupos. Como a pressão diastólica final reflete a pressão imposta pelo volume de sangue à parede da câmara no final da diástole, esta diminuição apresentada pelos animais do grupo monocrotalina treinado, somada à manutenção de uma aumentada pressão sistólica e hipertrofia ventricular, reflete, neste período de

tempo, o estabelecimento de uma fase compensatória durante o processo de desenvolvimento da insuficiência cardíaca.

#### **4.2.2 Derivadas de Contratilidade e Relaxamento**

A partir dos registros de pressão, foi possível calcular as derivadas de pressão em função do tempo ( $\pm dP/dt$ ). Em nosso estudo, a administração de MCT induziu alterações significativas nas derivadas tanto positiva (aumentando o índice de contratilidade) quanto negativa (diminuindo o índice de relaxamento) em todos os tempos de tratamento. De importante destaque é o fato de que o exercício físico foi capaz de atenuar estes valores. Estes resultados indicam que, quando comparados aos animais sedentários tratados, para um mesmo valor de pressão ventricular, o miócito cardíaco dos animais treinados apresentou um perfil contrátil mais próximo dos animais controles. Torna-se importante destacar, o fato de que, por estarem relacionados com o tempo, os índices de relaxamento e contratilidade são uma medida mais sensível para se avaliar o comportamento da função de bomba do coração. Deste modo, embora o treinamento físico não tenha sido capaz de modular os picos de pressão sistólica e diastólica, quando estes registros hemodinâmicos foram avaliados através das derivadas, podemos observar uma significativa redução nestes valores nos animais treinados tratados com monocrotalina. Este resultado quando somado aos já descritos anteriormente, sugerem uma melhora induzida pelo exercício na função contrátil do coração dos animais tratados com monocrotalina. Nesta situação experimental, estes animais foram capazes de manter uma contratilidade elevada ( $+dP/dt$ ) concomitante com uma maior capacidade de relaxamento ( $-dP/dt$ ).

Estas alterações hemodinâmicas apresentadas pelos animais tratados com monocrotalina e exercitados podem refletir as adaptações fisiológicas induzidas pelo exercício físico. O

desenvolvimento de bradicardia de repouso, aumento do consumo máximo de oxigênio, e aumento do aparato metabólico para fornecimento de energia via processo aeróbio se destacam como mecanismos de melhora da capacidade cardiovascular e respiratória induzida pelo treinamento físico. Além destes, as alterações nos processos hemodinâmicos através modulação do tônus vascular, têm recebido destaque na literatura.

Com a descoberta da participação dos fatores relaxantes e constritores derivados do endotélio, os mecanismos envolvidos na regulação do tônus vascular começaram a ser melhor compreendidos (Furchgott & Vanhoutte, 1989). Em especial, destaca-se a participação do óxido nítrico (NO) e da endotelina-1 (ET-1) nestes eventos.

Em uma recente revisão, Kojda & Hambrescht (2005) descrevem alguns mecanismos moleculares da adaptação vascular ao exercício. De importante destaque neste estudo, é o fato de que, o já bem descrito papel do exercício como indutor de vasodilatação se dá através de um aumento na produção de óxido nítrico resultante de um incremento na expressão da enzima NO sintase endotelial (eNOS). Além disto, estes mesmos autores apresentam dados que demonstram a possível participação das espécies reativas de oxigênio neste processo, tendo o peróxido de hidrogênio como principal sinalizador celular para a expressão da eNOS (Figura 4.1).

Outro mecanismo pelo qual o exercício físico pode modular as respostas hemodinâmicas, é através de alterações significativas na morfologia dos vasos arteriais. O treinamento físico induz tanto a formação de novos capilares (angiogênese) quanto o aumento de vasos já existentes (arteriogênese). Estas duas alterações morfológicas já foram observadas tanto em músculo esquelético como cardíaco, em modelos experimentais assim como em humanos (Prior et al., 2004).

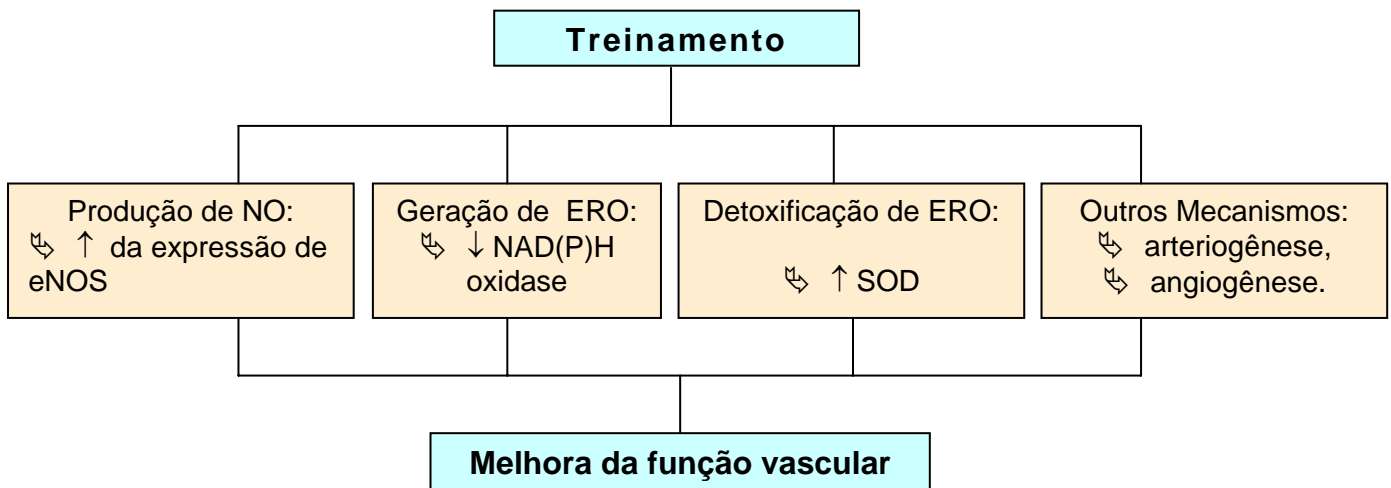


Figura 4.1: mecanismos propostos para a melhora da função vascular induzida pelo exercício. Adaptado de Kojda & Hambrescht (2005).

### 4.3 Dados de Estresse Oxidativo

Em nosso estudo, para ter acesso aos dados relativos ao estresse oxidativo dos grupos experimentais, avaliamos em eritrócitos e tecido cardíaco as medidas da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona S-transferase (GST). Neste mesmo sentido, também foram quantificados os danos oxidativos induzidos pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) em lipídios de membrana (processo denominado de lipoperoxidação, LPO) em eritrócitos, através da técnica de quimiluminescência (QL) e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em tecido cardíaco, assim como a capacidade antioxidante total (TRAP) em plasma.

Além da diminuída taxa de mortalidade verificada na quinta semana e da ausência de hipertrofia de ventrículo direito na terceira semana de tratamento, outro resultado de destaque apresentado em nosso estudo pelos animais tratados com monocrotalina e exercitados (MT) foi a significativa diminuição dos níveis de quimiluminescência apresentada por estes mesmos

animais na quarta e quinta semana de tratamento. Concomitante com estes resultados de sangue, os valores de TBARS em tecido cardíaco apresentados pelo grupo MT foram também significativamente menores quando comparados aos animais sedentários tratados com monocrotalina (MS). Como citado anteriormente, o estresse oxidativo é resultado de uma aumentada produção de ERO, sem um compensatório aumento na capacidade do sistema antioxidante. Na situação experimental apresentada em nosso estudo, a diminuição dos níveis de LPO induzida pelo exercício nos animais tratados com monocrotalina pode estar relacionada com a modulação da atividade do sistema de defesa antioxidante enzimático destes animais. Mesmo que a atividade destas enzimas seja tecido e tempo dependente, em sangue, o aumento da atividade da SOD na quarta semana e o aumento da GST em todos os três tempos de tratamento, assim como em tecido, o aumento da atividade da GST na terceira e quarta semana e um aumento da GPx em todos os tempos experimentais, apontam para uma participação destas enzimas na proteção dos danos oxidativos apresentados pelo grupo MT.

Apesar da indiscutível importância do papel da SOD como primeira linha de defesa contra as EROs e da CAT nos processos de metabolismo do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), em nosso estudo, se destaca a modulação das enzimas GPx e a GST induzida pelo treinamento físico. Deste modo, serão discutidas a seguir, algumas características comuns destas enzimas, dando destaque ao papel da GST no sistema biológico.

A glutathione (GST) é um tripeptídeo hidrossolúvel sintetizado a partir dos aminoácidos glutamina, cisteína e glicina. No meio intracelular, a GSH pode ser facilmente oxidada (GSSG) como também, rapidamente reduzida (GSH). A GSH é um antioxidante importante, atuando como agente detoxificador via ação catalítica das enzimas glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST) (Jefferies, 2003).

O estado redox da célula reflete o equilíbrio entre os níveis de oxidação e redução de seus elementos. Como já discutido anteriormente, durante o metabolismo energético regular ocorre a produção de ERO, deste modo, alterando constantemente o estado redox da célula. Neste sentido, a manutenção adequada da relação GSH/GSSG é de fundamental importância para a preservação da integridade celular. A GPx juntamente com a CAT e a SOD têm a função de proteger a célula contra a ação das ERO. Esta enzima detoxifica peróxidos através da atuação da GSH como doadora de elétrons nas reações de redução, tendo como produto final a GSSG. A regeneração (redução) da GSSG se dá através da ação da enzima glutathione reductase (GR) em um processo que requer a presença de NADPH. Sob condições de estresse oxidativo, ocorre um aumento na expressão da GR, sendo que alterações tanto na expressão quanto na atividade desta enzima estão relacionadas ao envelhecimento e desenvolvimento de câncer (Townsend et al., 2003).

Além da função antioxidante, a GSH está envolvida nos processos de resposta imune, na regulação da transdução de sinal intracelular através de moléculas como o fator de transcrição nuclear Kappa-B (NF- $\kappa$ B), assim como na modulação dos mecanismos de proliferação celular. As GSTs são uma família de enzimas consideradas da classe II de detoxificação, estando abundantemente presentes em todas as formas de vida. A GST humana é subdividida em três famílias: citosólica, mitocondrial e microsomal (denominada MAPEG). Em humanos o polimorfismo da MAPEG está relacionado com alterações na função pulmonar e um aumento no risco de infarto do miocárdio (Hayes et al., 2005).

Classicamente, estas diferentes GSTs são vistas como parte de um sistema de defesa celular contra numerosos produtos químicos tóxicos, tanto endógenos como também produzidos pelo meio ambiente. Esta importante função celular se dá através da ação catalítica na conjugação da GSH a uma grande variedade de compostos eletrofílicos (Strange et al., 2001). Além disso, mesmo

em *filos* de não-mamíferos, como nas plantas, a GST desempenha um papel importante no crescimento celular. Um trabalho demonstrou que mudas de tabaco geneticamente modificadas para uma expressão aumentada de GST e GPx apresentavam um crescimento significativamente mais rápido do que as plantas controle (Townsend et al., 2003).

Sugere-se que um aumento biológico das GSTs possa ser um processo de resposta adaptativa, pois várias substâncias indutoras destas enzimas geram estresse químico e processos carcinogênicos. Deste modo, as GSTs estão intimamente relacionadas ao desenvolvimento de resistência a agentes quimioterápicos, inseticidas, herbicidas e a determinados tipos de antibióticos, sendo este processo de adaptação o principal responsável pelo fracasso de várias terapêuticas farmacológicas (Hayes et al., 2005).

De importante destaque, além das funções já descritas das GSTs, é a sua interação com os membros da rota de sinalização celular mediada pela proteína quinase mitógeno-ativada (MAPK). Através da interação direta com as MAPKs JNK 1 e ASK 1, inibem a ligação com seus respectivos elementos-alvo e a conseqüente cascata de reações que induzem apoptose. Esta situação demonstra o possível mecanismo pelo qual as GSTs induzem tolerância a terapias químicas, mesmo quando as drogas utilizadas não são substratos para a seu aumento de expressão (Townsend et al., 2003).

A partir dos dados apresentados, fica evidente a participação da GST e GPx em vários mecanismos de controle do metabolismo celular, dentre eles a detoxificação de agentes xenobióticos através da conjugação com a GSH, nos processos de oxi-redução da GSH, na conversão de hidroperóxidos orgânicos e da inibição da sinalização para apoptose. Obviamente, todas estas vias de atuação destas enzimas antioxidantes estão relacionadas ao status redox da célula. Deste modo, mais uma vez o estresse oxidativo se apresenta como indutor de disfunções do sistema biológico.



Convém ressaltar, que também as alterações hemodinâmicas e estruturais do ventrículo direito apresentadas em nosso estudo convergem para a participação das ERO no desenvolvimento destas modificações. Apesar deste evidente papel, o exato mecanismo pelo qual ocorrem estas interações, permanece sem esclarecimento. A figura 4.2 apresenta as possíveis vias propostas para a participação das EROs nos processos que induzem as alterações estruturais, hemodinâmicas e bioquímicas descritas neste estudo.



## 5 CONCLUSÕES

Os dados obtidos durante o período experimental foram os seguintes:

1. Os animais tratados com monocrotalina (MCT) apresentaram diminuição de ganho de peso corporal e que o exercício não foi capaz de reverter estes valores;
2. O tratamento com MCT não promoveu congestão hepática e/ou pulmonar em nenhum dos tempos experimentais, quando relacionado peso úmido/peso seco destes órgãos;
3. Os animais tratados com MCT apresentaram hipertrofia de ventrículo direito em todos os tempos de tratamento, sendo que, o treinamento físico foi capaz de evitar este processo na terceira semana;
4. A MCT promoveu aumento significativo no pico de pressão sistólica do ventrículo direito nos três tempos de tratamento. A pressão diastólica se mostrou aumentada na terceira semana sendo que, o exercício foi capaz de promover uma diminuição destes valores na quarta semana;
5. Os valores dos índices de contratilidade ( $+dP/dt$ ) e de relaxamento ( $-dP/dt$ ) se mostraram elevados e diminuídos respectivamente, em todos os tempos de tratamento, sendo que o treinamento físico foi capaz de atenuar os valores de contratilidade e aumentar os valores de relaxamento;
6. Os níveis de lipoperoxidação indicados por quimiluminescência em eritrócitos e pelo teste de TBARS se mostraram elevados nos animais tratados com MCT sendo que, o exercício foi capaz de diminuir significativamente estes valores;
7. Tanto o tratamento com MCT quanto o protocolo de treinamento físico, foram capazes de modular a atividade

das enzimas antioxidantes, sendo que esta resposta foi tecido e tempo dependente. A adaptação enzimática mais evidente em nível sistêmico foi da GST e em tecido cardíaco foi da GPx e GST, sendo que estes parâmetros estão relacionados com a LPO.

Desta forma podemos concluir que:

1. Os dados de hipertrofia ventricular direita, somados aos resultados hemodinâmicos indicam que, nas condições experimentais apresentadas em nosso estudo, os animais tratados com MCT se encontravam em uma fase de adaptação compensatória transitória em resposta a um aumento de pós-carga imposta ao coração em função dos danos causados pela MCT ao pulmão. No período experimental avaliado não houve desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva;
2. O exercício físico foi capaz de reduzir a hipertrofia de ventrículo direito na terceira semana após administração de monocrotalina. Além disso, em todos os tempos de tratamento, o exercício promoveu alterações benéficas em termos de derivadas temporais de pressão do ventrículo direito. Estes resultados sugerem uma melhora da disfunção endotelial de vasos pulmonares promovido pelo treinamento físico, ocasionando deste modo, uma diminuição da pós-carga imposta ao ventrículo direito;
3. Concomitantemente à melhora hemodinâmica observada nos animais exercitados tratados com MCT, observou-se uma redução no estresse oxidativo. Desta forma, os resultados obtidos confirmam a hipótese inicialmente formulada.

## 6 PERSPECTIVAS de ESTUDO

Embora em nosso estudo, os resultados evidenciem que o treinamento físico tenha sido capaz de atenuar os efeitos deletérios induzidos pelo tratamento com MCT, o exato mecanismo pelo qual o exercício exerceu esta influência ainda não está completamente elucidado. Apesar de alguns dados conclusivos tenham sido encontrados, estes geraram novos questionamentos. Deste modo, é nosso entendimento que uma segunda etapa deste estudo deva ser desenvolvida no sentido de esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos neste processo, sendo os principais objetivos deste:

Em pulmão de animais com insuficiência cardíaca induzida por MCT, submetidos a um protocolo de treinamento físico, avaliar entre outros, a:

- ↳ Concentração de ET-1;
- ↳ Atividade da enzima NADPH diaforase;
- ↳ Quantificação de nitritos e nitratos;
- ↳ Atividade da enzima NO sintase.
- ↳ Relação GSH/GSSG

Em tecido cardíaco de animais com insuficiência cardíaca induzida por MCT, submetidos a um protocolo de treinamento físico, avaliar entre outros, a:

- ↳ Expressão ao nível de proteína dos fatores de transcrição ERK 1/2, p38 e ASK-1.
- ↳ Relação GSH/GSSG.

## 7 BIBLIOGRAFIA

ACSM (American College of Sports Medicine). **Posicionamento oficial: Exercício para pacientes com doença arterial coronariana.** *Rev. Bras. Med. Esp.* Vol 4, Nº 4:122-25, jul/ago, 1998.

ANTOZZI, C. & ZEVIANI, M. **Cardiomyopathies in disorders of oxidative metabolism.** *Cardiovasc. Res.* 35:184-199, 1997.

BELARDINELLI, R., GEORGIU, D., CIANCI, G. & PURCARO, A. **Randomized, controlled trial of long-term moderate exercise training in chronic hart failure.** *Circulation.* 99:1173-1182, 1999.

BERNOCCHI, P., CECONI, C., PEDERSINI, P., PASINI, E., CURELLO, S. & FERRARI, R. **Skeletal muscle metabolism in experimental heart failure.** *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28: 2263-2273, 1996.

BOVERIS, A. & CHANCE, B. **The mitochondrial generation of hydrogen peroxide.** *Biochem. J.*134: 707-716, 1973.

BRAUNWALD, E. **Heart Disease. A text book of cardiovascular medicine.** 5<sup>th</sup> ed. W. B. Saunders Company. Pennsylvania (USA), 1997.

BROWN, L., MILLER, J., DAGGER, A. & SERNIA, C. **Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats.** *Cardiovasc. Res.* 31(1):108-115, 1998.

BRUNNER, F. **Cardiac endothelin and big endothelin in right-heart hypertrophy due to monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rat.** *Cardiovasc. Res.* 44:197-206, 1999.

BUEGE, J.A. & AUST, S.D. **Microsomal lipid peroxidation.** *Meth. Enzymol.* 52: 302-309, 1978.

CARROL, E.C., HALLIWELL, B., BORISH, E.T., PRYOR, W.A., AMES, B.N., SAUL R.L. & MCCORD, J.M. **Oxygen radicals and human disease.** *Ann. Inter. Med.*. Vol. 107; NO. 4 October 1987.

CHESNEY, F.C., ALLEN, R.J. & HSU, C.I. **Right ventricular hypertrophy in monocrotaline pyrrole treated rats.** *Exp. Mol. Pathol.* 20:257-268, 1974.

DARLEY-USMAR, V. & HALLIWELL, B. **Blood radicals: Reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and vascular system.** *Pharm. Res.* Vol.13, No.5, 1996.

DOGGRELL, A.S. & BROWN, L. **Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure.** *Cardiovasc Res.* 39: 89-105, 1998.

DRABKIN, D.L. & AUSTIN, J. **Spectrophotometric Studies:Preparation from washed blood cells, nitric oxide hemoglobin and sulfahaemoglobin.** *J. Biol. Chem.* 112:51-57, 1935.

FARAHMAND, F., HILL, M.F. & SINGAL P.K. **Antioxidant and oxidative stress changes in experimental *cor pulmonale*.** *Mol Cell Biocem* 260:21-29, 2004.

FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** *Rev. Ass. Med. Brasil.* 43(1):61-8, 1997.

FLOHÉ, L. & GUNZLER W.A. **Assay of Glutathione Peroxidase.** *Meth. Enzymol.* 105: 114-121, 1984.

FURCHGOTT, R.F. & VANHOUTTE, P.M. **Endothelium derived relaxing and contracting factors.** *FASEB J.* 3:2007-2018, 1989.

GEORGIU, D. CHEN, Y., APPADOO, S., BELARDINELLI, R., GREENE, R., PARIDES, M.K. & GLIED, S. **Cost-effectiveness analysis of long-term**

**moderate exercise training in chronic heart failure.** *Am. J. Cardiol.* 87:984-988, 2001.

GIORDANO, J.F. **Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure.** *J. Clin. Invest.* 115:500-508, 2005.

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

GONZALEZ-FLECHA B., LLESUY, S. & BOVERIS, A. **Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle.** *Free. Rad. Biol. Med.* 10: 93-100, 1991.

GRASS, B. **Skeletal muscle VO<sub>2</sub> on-kinetics: set by O<sub>2</sub> delivery or by O<sub>2</sub> utilization? New insights into an old issue.** *Med Sci Sports Exerc* 32, No. 1:108:116, 2000.

HALLIWELL, B. **Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: How should we move forward?** *Cardiovasc. Res.* 47(3): 410-418, 2000.

HALPERN, B.N. & PACAUD, A. **Technique de prélèvement d'échantillons de sang chez les petits animaux de laboratoire par ponction du plexus ophtalmique.** *Comptes Rendu de la Société du Biologie.* 145:1465-1466, 1951.

HASENFUS G. **Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy.** *Cardiovasc. Res.* 39: 60-76, 1998.

HAYES, J. D., FLANAGAN, J. U. & JOWSEY, I. R. **Glutathione transferases.** *Ann Rev. Pharmacol Toxicol.* 45:51-88, 2005.

HILL, N.S., JEDERLINIC, P. & GAGNON, J. **Supplemental oxygen reduces right ventricular hypertrophy in monocrotaline-injected rats.** *J. Appl. Physiol.* 66(4):1642-1648, 1989.



HIROYUKI, T. **Novel pathophysiological insight and treatment strategies for heart failure.** *Circ. J.* 68:1095-1103, 2004.

HO, K.K.L., ANDERSON. K.M., KANNEL, W.B., GROSSMAN, W, & LEVY, D. **Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham heart study subjects.** *Circulation* 88:107-115, 1993.

JEFFERIES, H., COSTER, J., KHALIL, A., BOT, J., MCCAULEY, R. D. & HALL, J. C. **Glutathione.** *ANZ. J. Surg.* 73:517-522, 2003.

JONG, J.W., SCHOEMAKER, R.G., JONGE, R., BERNOCHI, P., KEIJZER, E., HARRISON, R., SHARMA, H.S., & CECONI, C. **Enhanced expression and activity of xantine oxireductase in the failing heart.** *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32:2083-2089, 2000.

KASAHARA, Y., KIYATAKE, K., TATSUMI, K., SUGITO, K., KAKUSAKA, I., YAGAMATA, S., OHMORI, S., KITADA, M. & KURIYAMA, T. **Bioactivation of monocrotaline by P-450 3 A in rat liver.** *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 30:124-129, 1997.

KAY, M.J. HARRIS, P. & HEATH, D. **Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of “Crotalaria spectabilis” seeds.** *Thorax.* 22: 176-179, 1967.

KHAPER, N., PALACE, V., HILL, M., KUMAR, D. & SINGAL, K.P. **Heart failure: A failed adaptation to oxidative stress.** *Adapt. Biol. And Med* Vol. 2 K. B. Pandolf, N. Takeda and P. K. Singal (Eds), Narosa Publishing house, New Delhi, India, 1999.

KOJDA, G. & HAMBRECHT, R. **Molecular mechanism of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy.** *Cardiovas. Res.* (article in press), 2005.

LIU, Y., WANG, D., RHALEB, N., YANG, X., XU, J., SANKEY, S.S., RUDOLPH, E.A. & CARRETERO, A.O. **Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase protects the heart against cardiac remodeling in mice with heart failure resulting from myocardial infarction.** *J. Cardiac. Fail.* Vol.11 No. 1 February 2005.

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

LOVOULOS, C., TITLLE, S., GOLDSTEIN, L., AUSTIN, J.D., SINGH, S., ROCCO, E., KEANE, J., TANG, P., KOPF, S.G. & ELEFTERIADES, A.J. **Right ventricle-sparing heart transplantation effective against iatrogenic pulmonary hypertension.** *J. Heart. Lung. Transplant.* 23(2):236-41, 2004.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, A.L., FARR, A.L. & RANDAL, R. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** *J. Biol. Chem.* 193:265-75, 1951.

MANNERVIK, B. & GLUTHENBERG, C. **Glutathione transferase (human placenta).** *Meth. Enzymol.* 77: 231-235, 1981.

MARKLUND, S. **Handbook of methods for oxygen radical research.** Boca Raton. CRC Press. 243-47, 1985.

MATTOCKS, A.R. **Toxicity of pyrrolizidine alkaloids.** *Nature.* 217, Feb (24):723-728, 1968.

McKELVIE, R.S., TEO, K.K., MCCARTNEY, N., HUMEN, D., MONTAGUE, T. & YUSUF, S. **Effects of exercise training in patients with congestive heart failure: a critical review.** *JACC.* 25:789-96, 1995.

McNABB, J.L. & BALDWIN, M.K. **Hemodynamic and metabolic effects of exercise in crostalaria-induced pulmonary hypertension in rats.** *J Appl. Physiol. (Respirat Environ Exercise Physiol)* 57(6):1829-33, 1984.

MEYER, K. **Exercise training in heart failure: recommendations based on current research.** *Med. Sci. Sports. Exerc.* Vol.33, No.4:525-531, 2001.

MEYRICK, B., GAMBLE, W. & REID, L. **Development of *Crotalaria* pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study.** *Am. J. Physiol.* 239 (Heart Circ Physiol 8): H692-702, 1980.

MONNET, E. & CHACHQUES J.C. **Animal models of heart failure: What is new?** *Ann. Thorac. Surg.* 79:1445-53, 2005.

NISHIDA K., HIROTANI, S., HIKOSO, S., HIGUSHI, Y., WATANABE, T., TAKEDA, T., OSUKA, S., MORITA, T., KONDOH, G., UNO, Y., KASHIWASE, K., TANIÍKE, M., NAKAI, A., MATSUMURA, Y., MIYAZAKI, J., SUDO, T., HONGO, K., KUSAKARI, Y., KURIHARA, S., CHIEN, R.K., TAKEDA, J., HORI, M. & OTSU, K. **p38 $\alpha$  Mitogen-Activated Protein Kinase Plays a Critical Role in Cardiomyocytes Survival but Not in Cardiac Hypertrophyc Growth in Response to Pressure Overload.** *Mol. Cell. Biol.*, p. 10611-10620, Dec 2004.

OMS/FIMS **Posicionamento oficial.** *Rev. Bras. Med. Esp.* Vol 4, Nº 4: 120-21, jul/ago, 1998.

PRIOR, B.M., YANG, H.T. & TERJUNG R.L. **What makes vessel grow with exercise training?** *J. Appl. Physiol.* 97:1119-1128, 2004.

ROSENBERG, H. & RESNICK, B. **Exercise intervention in patients with chronic obstructive pulmonary disease (CE).** *Geriatr. Nurs.* 24:90-97, 2003.

SCHAIBLE, F.T. & SCHEUER, J. **Cardiac function in hypertrophied hearts from chronically exercised female rats.** *J. Appl. Physiol. (Respirat Environ Exercise Physiol)* 50 (6):1140-45, 1981.

SEE, F., THOMAS, W., WAY, K., TZANIDIS, A., KOMPA, A., LEWIS, D., ITESCU, S. & KRUM, H. **p38 Mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and attenuates left ventricular remodeling following myocardial infarction in the rat.** *JAAC* Vol. 44, No.8, October 19, 1679-89, 2004.

SEYFART, T., GERBERSHAGEN, H., GIESSLER, C., LEINWEBER, K., HOFFMANN-HEINROTH, I., PÖNICKE, K. & BRODDE, O. **The cardiac  $\beta$ -adrenoceptor-G-protein(s)-adenyl cyclase system in monocrotaline-treated rats.** *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32:2315-26, 2000.

SIETSEMA, K. **Cardiovascular limitations in chronic pulmonary disease.** *Med Sci Sports Exerc.* Vol 33.no. 7, suppl. S656-s661, 2001.

SINGAL, K.P., KHAPER, N., BELLÓ-KLEIN, A. & BHAYANA, M. **Oxidative stress status in the transition of hypertrophy to heart failure.** *Heart. Fail. Rev.* 4, 353-360, 1999.

SINGAL, K.P., KHAPER, N., FARAHAMAND, F., BELLÓ-KLEIN, A. **Oxidative Stress in Congestive Heart Failure.** *Cur. Cardiol. Rep.* 2:206-11, 2000.

SOUZA-RABBO, M.P., ARAUJO, A.S.R., FERNANDES, T.R.G., OLIVEIRA, A.R., BELLÓ-KLEIN, A., KAUR, K. & SINGAL, P.K. **Influence of exercise training on cardiac and hepatic oxidative stress in rats.** *Exp Clin Cardiol.* 8(4):201-205, (2003).

STRANGE, R. C., SPITERI, M. A., RAMACHANDRAN, S. & FRYER, A.A. **Glutathione-S-transferase family of enzymes.** *Mut Res.* 482:21-26, 2001.

SULLIVAN M.J., HOWARD J.G., & FREDERICK R.C. **Altered skeletal muscle metabolic response to exercise in chronic heart failure: Relation to skeletal muscle aerobic enzyme activity.** *Circulation.* 84:1597-1607, 1991.

TERRACIO, L. & THOMAS, K.B. **Factors affecting cardiac cell shape.** *Heart Fail.* Volume 4, numbers 4 & 5, 1998.

THOMAS, H.C., LAMÉ, M.W., DUNSTON, S.K., SEGALL, H.J. & WILSON, D.W. **Monocrotaline pyrrole induces apoptosis in pulmonary artery endothelial cells.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151:236-244, 1998.

TOMBE, P. P. **Contractile function in heart failure.** *Cardiovasc. Res.* 37; 367-380, 1998.

TOWNSEND, D. M., TEW K. D. & TAPIERO H. **The importance of glutathione in human disease.** *Biochem. Pharmacol.* 57:145-155, 2003.

TSUTSUI, H., IDE, T., HAYASHIDANI, S., SUEMATSU, N., UTSUMI, H., NAKAMURA, R., EGASHIRA, K. & TAKESHITA, A. **Greater susceptibility of failing cardiac myocytes to oxygen free radical-mediated injury.** *Cardiovasc. Res.* 49:103-109, 2001.

VARIN, R., RICHARD, V., TAMION, F., DEVAUX, C., HENRY, JP., LALLEMAND, F., LEREBOURS, G. & THUILLEZ, G. **Exercise improves flow-mediated vasodilatation of skeletal muscle arteries in rats with chronic heart failure: role of nitric oxide, prostanoids, and oxidant stress.** *Circulation.* 99:2951-2957, 1999.

WAKATSUKI, T., SCHLESSINGER J. & ELSON E.L. **The biochemical response of the heart to hypertension and exercise.** *Trends. Bioch. Sci.* 29: No.11 nov/2004.

WERCHAN, M.P., SUMMER, R.W., GERDES, M.A. & MCDONOUGH, H.K. **Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension.** *Am. J. Physiol .256 (Heart Circ Physiol)* 25: H1328-H1336, 1989.

WILSON, D.W., SEGALL, H.J., PAN, L.C., LAMÉ, M.W., ESTEP J.E. & MORIN, D. **Mechanism and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity.** *Crit. Rev. Toxicol.* 22(5/6):307-325, 1992.

WÖLKART , G. STRÖMER H. & BRUNNER F. **Calcium handling and role of endothelin-1 in monocrotaline right ventricular hypertrophy of the rat.** *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32: 1995-2005, 2000.

YU, P.B. **Cellular defense against damage from reactive oxygen species.** *Physiol. Rev.* vol. 74. No. 1: 139-162, 1994.