



Instituto de Ciências Básicas da Saúde - ICBS

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**EFEITOS DO SUCO DE UVA PRETA NA MODULAÇÃO REDOX SENSÍVEL
DO REMODELAMENTO VENTRICULAR DIREITO EM MODELO DE
HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR**

Francisca Mosele

Orientadora: Prof(a) Adriane Belló-Klein

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia

Porto Alegre, 2009

*Perhaps down at the molecular level there's
been a chemical accident... – something
like a spilled tray of drinks, prompting
dopamine-like receptors to initiate a kindly
cascade of intracellular events..."*

Ian McEwan – Saturday

AGRADECIMENTOS

Ao final deste longo período de trabalho, poder olhar para trás e ter tantas pessoas a quem ser grata, faz com que tudo tenha valido a pena. Assim, meus agradecimentos são estendidos não somente àquelas pessoas que participaram diretamente deste projeto, mas a todas que fizeram parte desta história escrita ao longo dos últimos dois anos.

À minha família, pelo apoio e compreensão. À minha mãe, Silvana Mosele, por sempre acreditar nos meus sonhos e me incentivar a dar o melhor de mim, por ser meu porto seguro e minha melhor amiga. À minha avó, Elvira Tonietto, pelas incansáveis orações e torcida nos momentos mais importantes da minha vida. Aos meus tios, João Batista Mosele e Rosa Maria Mosele, por todo carinho e ajuda imprescindível para o meu crescimento.

À Prof(a) Adriane Belló-Klein, minha orientadora, sempre presente em todos os passos que levaram a conclusão desta dissertação, por acreditar em mim, e sempre ter sido um exemplo de pesquisadora, professora e pessoa.

À Ângela Maria Vicente Tavares, por me ensinar a importância de se realizar tudo da melhor maneira possível, e pela incansável ajuda e aprendizado, essenciais não só para a realização deste trabalho.

A todos os pesquisadores que fazem ou fizeram parte do laboratório de Fisiologia Cardiovascular, e ao Departamento de Fisiologia da UFRGS, nos últimos anos – Tânia, Karina, Cristina, Paulo, Rafael, Helena, Dai, Roberta, Fabiano, Rafaela, Gustavo, Cássio, Dhãniel, Daniela, Bruno, Cristiano - por me

avisarem que tudo podia dar errado, mas nunca me deixarem esquecer que no final as coisas sempre dão certas. Destacando a ajuda imprescindível da Mariane Bertagnolli, Alex Sander Rosa Araújo, Rafael Colombo e Fernanda Dreher. E a amizade e companheirismo do Vinícius Urbano Viegas. À Prof(a) Maria Flávia Ribeiro, pela oportunidade de realizar os experimentos em seu laboratório e diversos ensinamentos ao longo deste período. À grande amiga Ana Raquel Lehenbauer-Lüdke, que mesmo distante, se faz presente neste trabalho.

E aos demais amigos por sempre me apoiarem e pela compreensão da minha ausência. Em especial à Letícia Cerski Ribeiro, Lucas Soares Von Hohendorff, Fernanda Soares e Bruno Galperim, por tudo que representam para mim, pelo apoio, confiança e incentivo essenciais para a minha formação pessoal e profissional.

RESUMO

Este estudo foi delineado com o objetivo de investigar o envolvimento de vias de sinalização redox-sensíveis e a modulação destas pelo tratamento com suco de uva preta na progressão da hipertrofia ventricular compensatória à insuficiência cardíaca (IC) direita em resposta a sobrecarga de pressão crônica em modelo de hipertensão arterial pulmonar (HAP) induzida por monocrotalina (MCT). Para avaliarmos esta hipótese, utilizamos ratos Wistar machos recém desmamados, divididos quatro grupos experimentais, controle água; MCT água; controle suco; e MCT suco; tratados por seis semanas com água ou suco (10ml/kg/dia) através de sonda intragástrica. Na terceira semana, uma dose única de MCT (60mg/kg) foi administrada i.p. Ao final do protocolo, foram realizadas as avaliações ecocardiográficas e hemodinâmicas. Após os animais foram mortos por deslocamento cervical, o coração foi retirado e as câmaras separadas para as avaliações morfométricas. Todas as análises foram realizadas no tecido ventricular direito e constaram da determinação das concentrações de H_2O_2 e imunodeteção do conteúdo de Trx1, p-ERK1/2, p-Akt, p-JNK e caspase-3, através da técnica de Western blot. A indução de HAP por MCT após três semanas resultou em aumento na resistência vascular pulmonar, pressão sistólica e diastólica final do ventrículo direito, sem alterações na função ventricular esquerda. A presença de hipertrofia ventricular direita foi constatada, e acompanhada da ativação de p-ERK1/2 mediada pelo sistema H_2O_2 -Trx1, associada ao aumento da expressão de caspase-3, mas não p-JNK ou p-Akt. O pré-tratamento com suco de uva resultou em melhora

da resistência vascular pulmonar e parâmetros hemodinâmicos. Apesar de não reduzir a hipertrofia ventricular direita, resultou em inibição da sinalização mediada pelo H_2O_2 através do aumento da imunodeteção de Trx1 e redução de caspase-3. A indução de adaptação através de uma ação pró-oxidante do suco de uva pode ser um dos fatores envolvidos na melhora das respostas cardíacas.

ABSTRACT

This study was designed with the aim of investigate the involvement of redox-sensitive pathways and the role of purple grape juice treatment in the progression of compensatory ventricular hypertrophy to right heart failure in response to chronic pressure overload in monocrotaline (MCT)-induced pulmonary arterial hypertension (PAH). To test this hypothesis, we used just-weaned male Wistar rats separated in four groups: water control; water MCT; juice control; and juice MCT, treated for 6 weeks with water or purple grape juice (10ml/kg) by gavage. On the third week, a single injection of MCT (60 mg/kg body weight i.p.) or equal volume of saline was administrated. At the end of the protocol animals were assessed echocardiographically and hemodynamically. After that, animals were killed by cervical dislocation, the heart was removed and chambers separated to morphological evaluations. All analysis was performed in the right ventricle tissue and consisted to the determination of H₂O₂ concentration, and protein expression of Trx1, p-ERK1/2, p-JNK and cleaved caspase-3, through Western blot technique. MCT-induced PAH resulted, after three weeks, in increased pulmonary vascular resistance, right ventricle systolic and final diastolic pressure, without any change in the left ventricular function. The right ventricle hypertrophy was evidenced and followed by H₂O₂-Trx1 system activation of ERK1/2 related to increased cleaved caspase-3 expression, but not p-JNK or p-Akt. The pre-treatment with purple grape juice decreased pulmonary vascular resistance and hemodynamic parameters. Despite that no changes in ventricular hypertrophy were seen,

purple grape juice was capable to inhibit H_2O_2 signaling through a potentiaded imunodetection of Trx1 and reduced cleaved caspase-3 expression. Purple grape juice induced an adaptation process acting as a pro-oxidant agent wich may be one of the factors involved in the improvement of cardiac performance.

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	Proteína quinase amino terminal
AP-1	Proteína ativadora-1
ASK-1	Proteína quinase reguladora de sinais apoptóticos-1
AT	Tempo de aceleração (fluxo através da artéria pulmonar)
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
ERK1/2	Proteína quinase reguladora de sinais extracelulares
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET	Tempo de ejeção (fluxo através da artéria pulmonar)
ET-1	Endotelina-1
Grx	Glutaredoxina
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
HAP	Hipertensão arterial pulmonar
HO-1	Heme oxigenase-1
IC	Insuficiência cardíaca
JNK	Proteína quinase c-Jun NH-terminal
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MCT	Monocrotalina
NFκB	Fator nuclear kB
NO	Óxido nítrico
PDFVD	Pressão diastólica final do ventrículo direito

PDI	Proteína dissulfeto isomerase
PI3K	Proteína quinase fosfoinositideo-3
PKC	Proteína quinase C
Prx	Peroxiredoxina
PSVD	Pressão sistólica do ventrículo direito
SOD	Superóxido dismutase
Trx1	Tioredoxina-1
VE	Ventrículo esquerdo
VD	Ventrículo direito

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Patofisiologia da Hipertensão Arterial Pulmonar.....	22
FIGURA 2: Vias das caspases	30
FIGURA 3: Esquema geral da geração de vias de sinalização pelas EROs e sistema antioxidante no coração	39
FIGURA 4: Imagem representativa dos registros ecocardiográficos por Doppler Pulsátil do fluxo na artéria pulmonar três semanas após a indução de HAP por MCT	65
FIGURA 5: Efeitos do tratamento com suco de uva preta na razão AT/ET nos distintos grupos	66
FIGURA 6: Efeito do tratamento com suco de uva preta (A) na pressão sistólica do VD e (B) pressão diastólica final do VD	67
FIGURA 7: Correlação entre variações da resistência vascular pulmonar, representadas pela Razão AT/ET e índice de hipertrofia do ventrículo direito (VD)	69
FIGURA 8: Determinação das concentrações de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) no ventrículo direito	71
FIGURA 9: Análise do imunocontéudo de Trx1 por Western Blot em homogeneizado de ventrículo direito	72
FIGURA 10: Análise do imunocontéudo de p-ERK1/2 por Western Blot em homogeneizado de ventrículo direito	73
FIGURA 11: Análise do imunocontéudo de p-Akt por Western Blot em homogeneizado de ventrículo direito	74

FIGURA 12: Análise do imunoconteúdo de p-JNK por Western Blot em homogeneizado de ventrículo direito	75
FIGURA 13: Análise do imunoconteúdo de caspase-3 por Western Blot em homogeneizado de VD	76
FIGURA 14: Correlação entre variações da resistência vascular pulmonar, representadas pela razão AT/ET e caspase 3 em VD	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Análise dos índices de hipertrofia cardíaca e ventricular dos distintos grupos ao final do protocolo experimental	68
TABELA 2: Avaliação da função ventricular esquerda por ecocardiografia através da avaliação em modo 2D e fluxo por Doppler nos distintos grupos ao final do protocolo experimental.....	70

ÍNDICE

RESUMO	V
ABSTRACT	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIII
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Hipertensão Arterial Pulmonar	17
1.1.1 PATOFISIOLOGIA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR	21
1.1.2 FUNÇÃO VENTRICULAR DIREITA	24
1.1.3 MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA	27
1.2 Progressão da Hipertrofia Cardíaca à Insuficiência Cardíaca: Papel da Apoptose	29
1.2.1 APOPTOSE E VIA DAS CASPASES	29
1.2.2 APOPTOSE E FUNÇÃO CARDÍACA	32
1.2.3 APOPTOSE NO REMODELAMENTO CARDÍACO	34
1.3 Estresse Oxidativo e Sinalização Celular	36
1.3.1 PAPEL DA SINALIZAÇÃO REDOX NO REMODELAMENTO CARDÍACO	40
1.4 Regulação da Oxidação de Proteínas e Sinalização Redox: Papel do Sistema Tio redoxina 1	42

1.4.1 EFEITOS POTENCIAIS DA TRX-1 NA DOENÇA CARDÍACA	45
1.5 Compostos Polifenólicos da Uva Preta: Proposta Terapêutica	48
2. HIPÓTESE	52
3. OBJETIVOS	53
3.1 Objetivo geral	53
3.2 Objetivos específicos	53
4. MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1 Experimentação Animal	55
4.1.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	55
4.1.2 CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL	55
4.1.3 AMOSTRA	56
4.1.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS	56
4.1.5 MODELO EXPERIMENTAL	57
4.1.6 TRATAMENTO: SUCO DE UVA PRETA	57
4.1.7 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	57
4.2 Análises	57
4.2.1 AVALIAÇÕES FUNCIONAIS	57
4.2.1.1 Análises Ecocardiografia	58
4.2.1.2 Análises Hemodinâmicas	59
4.2.2 AVALIAÇÕES MORFOMÉTRICAS	60
4.2.2.1 Peso Corporal	60
4.2.2.2 Índice de Hipertrofia Cardíaca e de Câmaras.....	60
4.2.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	61

4.2.3.1 Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	61
4.2.4 ANÁLISE DO IMUNOCONTEÚDO PROTÉICO POR WESTERN BLOT	61
4.2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICA	62
5. RESULTADOS	64
5.1 Resistência vascular pulmonar na HAP induzida por MCT	64
5.2 Avaliação hemodinâmica do ventrículo direito (VD) em reposta à resistência vascular pulmonar	66
5.3 Índices de hipertrofia cardíaca e ventricular	68
5.4 Função ventricular esquerda na HAP induzida por MCT ..	69
5.5 Determinação das concentrações de H ₂ O ₂ no ventrículo direito	71
5.6 Análise do imunoconteúdo de Trx1 no ventrículo direito .	72
5.7 Análise da ativação de vias adaptativas no ventrículo direito: ERK1/2 e Akt	73
5.9 Análise da ativação de vias não-adaptativas no ventrículo direito: JNK e caspase-3	75
6. DICUSSÃO	78
7. CONCLUSÃO	100
8. REFERÊNCIAS	101

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão Arterial Pulmonar

A Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP) é uma doença crônica das arteríolas pulmonares, caracterizada pela proliferação e remodelamento vascular, levando a um progressivo aumento na resistência vascular pulmonar e pressão arterial pulmonar, associada à hipertrofia ventricular direita, e finalmente à insuficiência cardíaca (IC) direita (Runo & Loyde, 2003).

O dano vascular pulmonar associado à HAP ocorre de uma forma idiopática ou ainda em associação com outras doenças ou exposições e é provavelmente um desfecho comum em resposta a fatores ambientais e patológicos acoplados à susceptibilidade genética (Chin & Rubin, 2008).

O sistema de nomenclatura atual, proposto em 2003 pela Organização Mundial da Saúde agrupa as diferentes formas de hipertensão pulmonar baseado nas similaridades entre sua patofisiologia e respostas ao tratamento. Atualmente, cinco principais grupos de hipertensão pulmonar são reconhecidos: (1) HAP; (2) hipertensão pulmonar associada à doença cardíaca esquerda; (3) hipertensão pulmonar associada à doença pulmonar e/ou hipóxia; (4) hipertensão pulmonar devido à doença trombolítica crônica e/ou embolítica; e (5) hipertensão pulmonar heterogênea (Chin & Rubin, 2008).

Embora se admita que não haja uma definição uniforme para a HAP, os critérios hemodinâmicos propostos pelo National Institutes of Health Registry, incluem, uma pressão arterial pulmonar média >25 mmHg em repouso, ou >30

mmHg durante o exercício, acompanhada de um débito cardíaco normal ou reduzido e pressão capilar pulmonar normal, com aumento de resistência pulmonar ≥ 3 unidades. A HAP é classificada como idiopática quando a origem da doença é desconhecida, familiar quando a causa é genética, ou secundária a outros processos patológicos (ex: infecção por HIV, drogas e toxinas) (Simonneau et al., 2004).

A maior parte dos pacientes com HAP apresenta dispnéia ao esforço, que progride por meses a anos. A dor torácica ao esforço, síncope, fadiga, e edema de extremidades inferiores, são indicativos de HAP mais severa com presença de disfunção ventricular direita. Apesar de ser uma desordem relativamente rara, com uma incidência de 2-3 casos por milhão por ano, estudos em necropsia têm mostrado uma prevalência de 1.300 casos/1.000.000 (Gaine et al., 1998; Rudarakanchana et al., 2001).

As mulheres são mais afetadas por esta doença do que homens, em uma razão de 2,3:1, para o diagnóstico em qualquer idade. A idade para o diagnóstico tem sido descrita entre 36 e 50 anos, entretanto, com a utilização da classificação mais recente, e inclusão grupos que incluem HAP associada a outras doenças (particularmente escleroderma ou esclerodermia), mostra uma média de idade maior para o diagnóstico (Humbert et al., 2006; Thenappan et al., 2007).

O diagnóstico é geralmente concluído a partir de achados obtidos de exames físicos e sintomas não específicos vivenciados pelos pacientes. No entanto, a estabilização do diagnóstico e etiologia da HAP necessita de uma avaliação ampla que inclua teste de função pulmonar, sorologia para doença

de tecido conjuntivo, ecocardiografia, cateterismo cardíaco, e testes que excluam doença trombolítica crônica (Chin & Rubin, 2008).

A ecocardiografia é geralmente o primeiro teste diagnóstico que sugere a presença de HAP. A pressão arterial pulmonar sistólica pode ser estimada de forma não invasiva através de técnicas de Doppler e, quando é observada regurgitação tricúspide, estas estimativas apresentam uma ótima correlação com métodos invasivos, para a determinação da mesma. No entanto, o erro padrão desta estimativa é geralmente grande, 5 a 8 mmHg e os resultados para pacientes individualmente devem ser avaliados somente como uma estimativa da atual pressão arterial pulmonar que deve ser confirmada através de cateterismo ventricular direito (Berger et al., 1985; Currie et al., 1985). Outro achado comum na ecocardiografia inclui a dilatação do ventrículo direito (VD), movimento paradoxal do septo intraventricular, e insuficiência tricúspide. A infiltração pericárdica pode também ser visualizada e, na ausência de doença do tecido conjuntivo, este se correlaciona com as elevadas pressões no átrio direito (Hinderliter et al., 1999).

A HAP é considerada uma doença devastadora e progressiva, com um péssimo prognóstico e sem nenhuma terapia de cura. A história natural da HAP descrita pelo National Institutes of Health nos anos 80, antes da introdução das terapias que incluem drogas vasodilatadoras como antagonistas dos canais de cálcio, prostaciclina, e óxido nítrico (NO), mostravam uma média de sobrevivência <3 anos, com uma expectativa de sobrevivência de 5 anos em apenas 34% dos pacientes (Rich et al., 1987).

Desde então, a sobrevida aumentou, ao ponto em que os pacientes geralmente não são encaminhados a transplante de pulmão no momento do diagnóstico. Em vez disso, a maior parte dos pacientes inicia a terapia medicamentosa e é reavaliada após um período mínimo de sete meses. A sobrevida após cinco anos, entre pacientes tratados com epoprostenol (forma sintética de prostaciclina) gira atualmente entre 47% a 55% com uma sobrevida após cinco anos >70% entre aqueles com classe funcional I ou II (McLaughlin et al., 2002).

Apesar de alguma melhora hemodinâmica ser vista imediatamente após o início do tratamento, muitos pacientes não apresentam uma resposta aguda vasodilatadora pulmonar significativa. Estes pacientes, quando reavaliados após vários meses, ainda apresentam uma melhora hemodinâmica, potencialmente derivada dos efeitos do tratamento no crescimento e remodelamento da vasculatura pulmonar. O aumento da capacidade ao exercício e redução dos sintomas se inicia com algumas semanas de tratamento e atingem um platô em torno da 12^o a 16^o semana. Esta melhora geralmente se mantém por anos, mas existe uma significativa variabilidade e a subsequente piora não é incomum (Sitbon et al., 2001).

Entre aqueles pacientes que tenham desenvolvido sinais e sintomas de IC direita, o índice de sobrevida é muito menor do que entre aqueles que apresentam somente aumentos na pressão arterial pulmonar e, a maior parte dos marcadores de prognóstico, avalia alguns aspectos da função ventricular direita tanto em repouso quanto durante o exercício. Marcadores pós-tratamento de péssimo prognóstico incluem um aumento da pressão atrial

direita, deterioração do índice de desempenho miocárdico, baixa saturação de oxigênio em sangue venoso, sintomas continuados de função classe III/IV, baixa capacidade ao exercício, infiltração pericárdica e níveis elevados de peptídeo atrial natriurético (Nagaya et al., 2000; Raymond et al., 2002).

O grau de elevação na pressão arterial pulmonar pode ainda ser um preditivo, mas esta é mais importante somente enquanto a função do VD é ainda relativamente normal. A incapacidade de se mostrar alguma melhora entre os sintomas iniciais e os do seguimento da doença, parâmetros hemodinâmicos, e tolerância ao exercício são alguns sinais de péssimo prognóstico (Chin & Rubin, 2008).

1.1.1 PATOFISIOLOGIA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

Embora a disfunção ventricular direita certamente contribua para a descompensação clínica, o estímulo inicial para o processo patogênico aparece localizado na própria vasculatura pulmonar. Achados histológicos característicos (figura 1), semelhantes em todos os tipos de HAP, ocorrem ao nível das arteríolas pulmonares e incluem fibrose da camada íntima, localização distal e proliferação do músculo liso vascular, e oclusão arterial pulmonar (Humbert et al., 2004). Além disso, um indicativo de severidade, nos estágios finais da doença, é a formação de uma “neoíntima” vascular, caracterizada pelo aumento da deposição de matriz extracelular e miofibroblastos. Lesões plexiformes são predominantemente caracterizadas pelo aumento da proliferação e ancoramento de células semelhantes ao endotélio sobre o lúmen do vaso (Jeffery & Morrell, 2002).

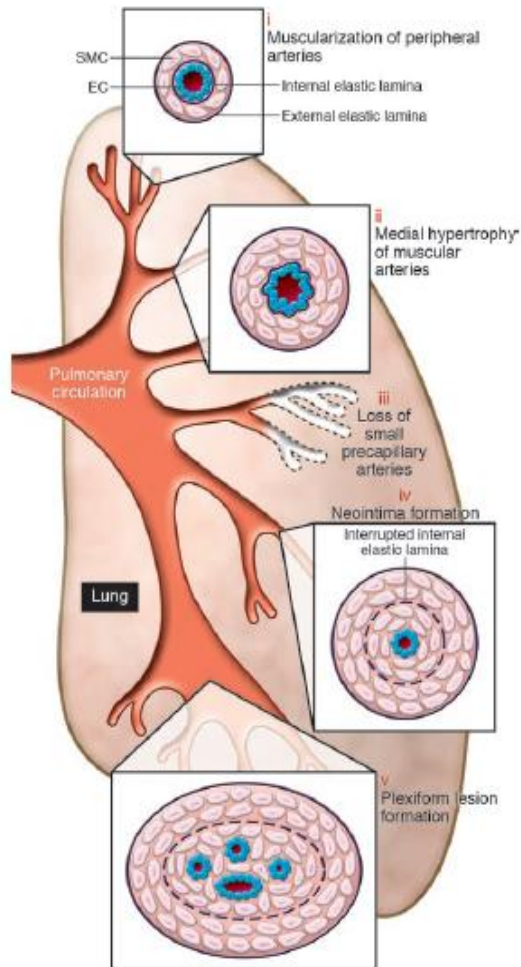


Figura 1: Patofisiologia da Hipertensão Arterial Pulmonar. O esquema ilustra as diferentes anormalidades vasculares comparadas com a circulação pulmonar normal, associadas à HAP. Este esquema descreve as anormalidades através da circulação pulmonar, incluindo (i) muscularização anormal de arteríolas pré-capilares distais; (ii) hipertrofia medial (espessamento) da musculatura das grandes artérias pulmonares; (iii) perda de artérias pré-capilares; (iv) formação da neointima, que é particularmente oclusiva em vasos de 100-500 μm , e (v) formação de lesões plexiformes nestes vasos. Retirado de Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Invest.* 118:2372–2379 (2008).

Múltiplos tipos celulares na parede da artéria pulmonar e circulação arterial pulmonar contribuem para respostas específicas à injúria e o desenvolvimento do remodelamento vascular (Jeffery & Morrell, 2002). O endotélio atua como um sensor central de estímulos lesivos como hipóxia, estresse de cisalhamento, inflamação e toxinas. A perda da regulação dos efetores da cascata vascular, que controlam a vasodilatação e vasoconstrição, supressores e fatores de crescimento, e mediadores pró e antitrombóticos, pode ser resultado tanto do início da injúria celular endotelial ou de sua disfunção. No entanto, estudos mais recentes sugerem que a disfunção de

componentes vasculares alternativos, como fibroblastos adventiciais ou componentes da matriz extracelular, podem também incitar a doença vascular pulmonar (Stenmark et al., 2002).

A alteração na produção endógena de moléculas vasoativas tem sido associada à progressão da HAP. O mais bem descrito destes fatores é o NO, que além de potente vasodilatador arterial pulmonar, ainda é capaz de inibir diretamente a ativação plaquetária e proliferação vascular de células musculares lisas. Sua síntese é mediada pela NO sintase endotelial (eNOS) através de múltiplos estímulos como fatores vasoativos e estímulos fisiológicos (hipóxia, inflamação e estresse oxidativo). Pacientes com HAP geralmente apresentam níveis reduzidos de eNOS na vasculatura pulmonar, sugerindo que este possa ser um dos mecanismos envolvidos na desregulação da vasoconstrição, justificando a utilização de inalação de NO e sildenafil, um inibidor da 5-fosfodiesterase, nestes pacientes (Galie et al., 2005) .

Apesar disso, Maison et al., 1998, demonstraram um aumento na expressão de eNOS especificamente em lesões plexiformes na HAP, sugerindo que este aumento nos níveis de NO podem levar à proliferação celular nestas lesões, no entanto esta hipótese não foi comprovada. Além disso, não só a atividade da eNOS, mas também o processo de transporte no sangue deve ser esclarecido, assim como sua relação com o estresse oxidativo observado nestes pacientes.

De forma semelhante, o monóxido de carbono, outro gás vasodilatador, produzido principalmente pela enzima heme oxigenase-1 (HO-1) na vasculatura pulmonar parece estar envolvido na patogênese da HAP. Estudos

experimentais em ratos *knockout* para HO-1, demonstram uma baixa tolerância à hipóxia resultando em disfunção ventricular direita. Por outro lado, o aumento da expressão de HO-1 em modelo de hipóxia crônica e HAP induzida por monocrotalina (MCT), previnem o desenvolvimento da HAP (Christou et al., 2000; Zuckerbraum et al., 2006).

Embora os processos iniciais estejam associados com um desbalanço da secreção de fatores vasoativos e remodelamento vascular, estes ainda incluem uma excessiva proliferação celular, vasoconstrição e trombose, associadas com processos inflamatórios e angiogênese. A transdiferenciação de células endoteliais a células musculares lisas e identificação de amplificações monoclonais em populações complexas tem levado a especular que os estágios finais da HAP são similares à progressão do câncer, com a desregulação do ciclo celular e apoptose como desfechos predominantes (Zhu et al., 2006).

Apesar do foco principal dos mecanismos responsáveis pela HAP sejam as arteríolas pulmonares, existem evidências de que o enrijecimento das artérias pulmonares proximais possa também ser crítico não somente na pressão arterial pulmonar, mas também na função ventricular direita (Mahmud et al., 2007).

1.1.2 FUNÇÃO VENTRICULAR DIREITA

Está bem definido que a espessura e a complacência do VD respondem à sobrecarga de pressão através de um controle insuficiente de tensão e conseqüente dilatação. Este defeito intrínseco do VD associado a uma diminuição do volume ejetado e débito cardíaco é definido como *Cor*

pulmonale. Esta síndrome é responsável por 5% a 10% das doenças cardíacas, 20% de todos os casos de IC e quase 20% dos casos de internação hospitalar relacionado a doenças cardíacas (Baum et al., 1998).

A HAP é caracterizada por um aumento crônico na pós-carga ventricular direita, normalmente acompanhado por reduções na fração de ejeção de forma similar à descrita para o ventrículo esquerdo (VE). Em resposta ao aumento de resistência vascular, observam-se alterações profundas nas pressões sistólicas e diastólicas do VD que acompanham de forma linear a progressão da doença. Enquanto em estágios iniciais, o aumento da pressão sistólica está relacionado a uma resposta adaptativa frente à sobrecarga de pressão, sem alterações na pressão diastólica final, a progressão do quadro leva a uma disfunção ventricular generalizada associada a estágios finais de IC (Farahmad et al., 2004).

Pacientes com HAP avançada apresentam uma sobrecarga de volume severa, diminuição do débito cardíaco, pressão sangüínea marginal, e por vezes, um aumento nos níveis de creatinina circulante, relacionado tanto a um processo agudo, quanto à piora da função ventricular direita. Estes efeitos parecem estar mais envolvidos com a interdependência ventricular do que propriamente com o mecanismo de Frank-Starling. Assim, esta interdependência desempenha um papel essencial na patofisiologia da disfunção ventricular direita e progressão à IC (Santamore et al., 1998).

Diversas evidências têm demonstrado que a sobrecarga de pressão ou volume sobre o VD, bem como a dilatação deste, leva ao deslocamento do septo em direção ao VE, gerando alterações profundas na sua geometria,

aumentos na restrição pericárdica e diminuições na complacência. Como consequência, as curvas de pressão-volume do VE alteram-se para a esquerda e para cima, o que potencialmente leva à diminuição da pré-carga ventricular esquerda e aumento na pressão diastólica final, associada, em estados mais severos, à diminuição no débito cardíaco (Haddad et al., 2008).

As bases moleculares desta falha biomecânica permanecem pouco entendidas. No entanto, resultados obtidos em experimentos com suínos trazem evidências de que o aumento da pressão arterial pulmonar gera precocemente danos irreversíveis e deletérios aos cardiomiócitos. Neste caso, a disfunção do VD persiste mesmo após a normalização da pressão arterial pulmonar sendo que estas lesões se mostram correlacionadas à magnitude do estímulo (Greyson et al., 2000).

A doença ventricular direita, em contraste com a doença ventricular esquerda, permanece relativamente pouco estudada e/ou compreendida. Esta disparidade tem sido reconhecida, e recentemente o National Heart, Lung and Blood Institute concluiu que apesar das informações sobre o ventrículo direito serem limitadas, a diminuição da sua capacidade, não só em resposta à sobrecarga de pressão crônica, mas em vários estados patológicos, e seu impacto sobre a progressão destas doenças sugerem que o ventrículo direito possa representar um importante determinante no colapso cardíaco (Voelkel et al., 2006).

1.1.3 MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA

Experimentalmente, o modelo de HAP induzida por MCT tem sido amplamente utilizado em cães e ratos para a indução de HAP e hipertrofia ventricular direita. Por mimetizar a fisiopatologia da HAP em humanos, este modelo traz a possibilidade de avaliação da proliferação neointima durante a hipertrofia pulmonar e sua modulação, hipertrofia ventricular direita, regulação da expressão gênica, modulação neuroendócrina e variações hemodinâmicas em resposta à HAP (Werchan et al., 1989).

A MCT é um alcalóide pirrolizidina encontrado em plantas da espécie *Crotalaria spectabilis*. A administração desta causa uma síndrome vascular pulmonar caracterizada pela proliferação da vasculatura pulmonar, HAP e *Cor Pulmonale*. Os seus efeitos dependem da sua biotransformação hepática pela ação do sistema monooxigenase do citocromo P450 para formar dihidromonocrotalina, que então, é circulada ao parênquima pulmonar além de outros órgãos extra-hepáticos como cérebro e rins (Monnet & Chachques, 2005).

Uma injeção subcutânea única de MCT (60mg/kg) em ratos induz progressiva injúria endotelial pulmonar, resultando em HAP e alterações cardiopulmonares após um período de 10 a 14 dias. Os danos iniciais sobre a vasculatura pulmonar levam a um aumento da permeabilidade capilar, edema intersticial moderado, acúmulo de macrófagos, modificação dos pneumócitos tipo II e edema alveolar. Em resposta a estas mudanças ocorre degeneração endotelial ou hiperplasia, hipertrofia da musculatura lisa medial e edema da

adventícia, levando assim, ao aumento da resistência vascular e sobrecarga de pressão (Gillespie et al., 1986).

Diversas evidências têm se acumulado sugerindo que múltiplos fatores contribuem para a regulação das respostas celulares na HAP induzida por MCT, assim como em várias formas de hipertensão pulmonar. Durante o desenvolvimento da HAP encontram-se alterações precoces na reatividade vascular pulmonar marcada principalmente pelo aumento da resposta a substâncias vasoconstritoras. Frasch et al (1999) demonstraram, uma semana após a indução um aumento nos níveis de NO endotelial e endotelina-1 (ET-1) de forma proporcional à severidade da HAP neste modelo, como uma tentativa de manutenção da eficiência das trocas gasosas. No entanto, a partir da segunda semana, ocorre uma redução generalizada na contratilidade de artérias pulmonares isoladas associadas à diminuição da resposta a substâncias vasodilatadoras como isoprotenol e acetilcolina.

Este aumento sustentado da pós-carga resulta em alterações hemodinâmicas e morfológicas no VD que mimetizam a progressão da doença encontrada em humanos. Mesmo após 1 semana de indução, já são observadas alterações na pressão sistólica desenvolvida pelo VD, que com a progressão do remodelamento vascular são acompanhadas por aumentos no mesmo sentido da pressão diastólica final do VD (Farahmad et al., 2004). As alterações na pressão vascular pulmonar correlacionam-se positivamente com o aumento da massa do VD e estão associadas ainda com a redução gradual da fração de ejeção, com os menores valores nos animais com sinais de IC

direita, apesar de a hipertrofia nestes ser substancialmente maior (Hessel et al., 2006).

1.2 Progressão da Hipertrofia Cardíaca à Insuficiência Cardíaca: Papel da Apoptose

1.2.1 APOPTOSE E VIA DAS CASPASES

O fenômeno celular de morte programada ou apoptose descreve a destruição regulada e ordenada de células disfuncionais, marcadas por um programa genético organizado. Duas vias de sinalização principais têm sido descritas por precipitarem a morte celular tanto pela ativação de receptores na superfície celular - via extrínseca - ou pela ruptura da barreira mitocondrial externa com liberação simultânea de moléculas pró-apoptóticas a partir da mitocôndria para o citosol - via intrínseca (Kunapuli et al., 2006). Ambas as vias convergem em uma via de sinalização que medeia as alterações morfológicas e bioquímicas características da apoptose (figura 2).

As moléculas chave em ambas as vias são membros de uma família de proteases cisteína aspartato específicas, conhecidas como caspases. As caspases são ativadas durante a apoptose e compartilham uma especificidade de clivagem seletiva de proteínas-alvo em sítios próximos a resíduos de ácido aspártico (Schwerk & Schulze, 2003).

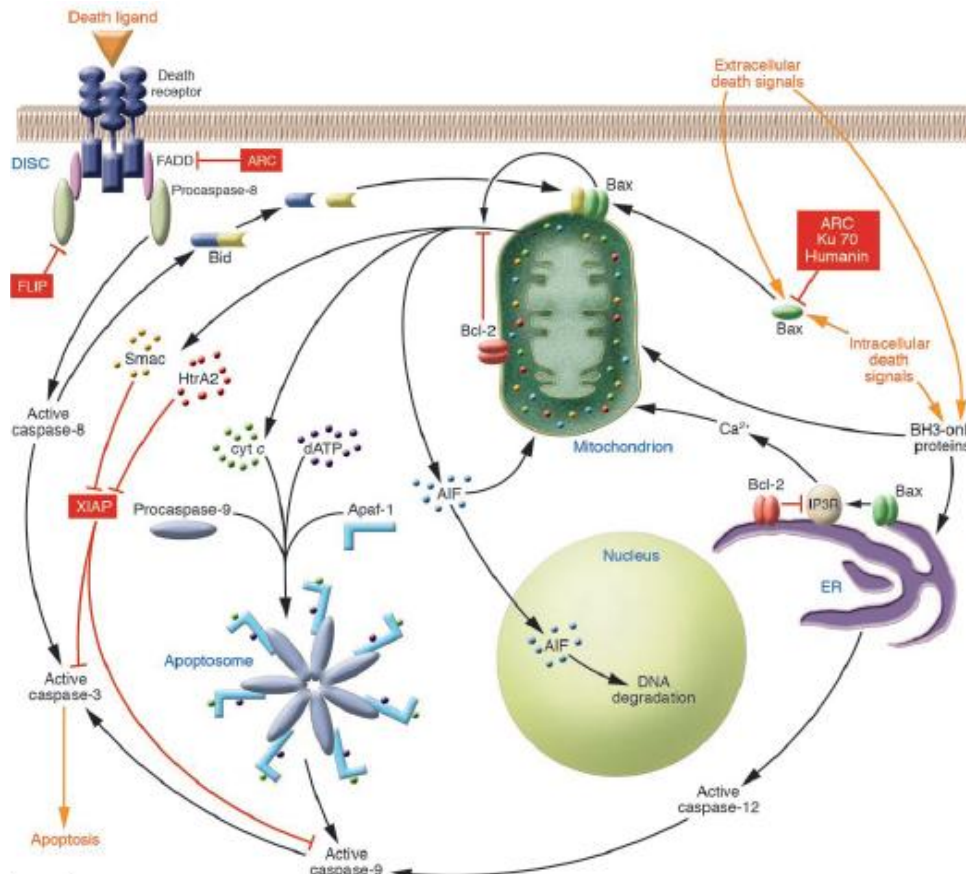


Figura 2: Via das caspases. Na via extrínseca, o acoplamento de um ligante leva o receptor de morte a recrutar FADD, que por sua vez recruta a pró-caspase 8. Dentro deste complexo de morte (DISC), a pró-caspase 8 dimeriza e ativa. A caspase 8 ativa de forma proteolítica a pró-caspase 3, que por sua vez cliva proteínas celulares levando à morte celular. Na via intrínseca, sinais estimulatórios extra e intracelulares são transferidos à mitocôndria através de uma variedade de proteínas BH3 (ex, BID) e através da Bax, que então é translocada e se insere na membrana mitocondrial externa. Bax e Bak (não mostrada) estimulam a liberação de citocromo C (cyt c) e outros apoptogênicos. Uma vez liberado, o citocromo c se liga a Apaf-1 (fator de ativação de protease apoptótica) juntamente com dATP. Esta conformação precipita a oligomerização do Apaf-1 e recrutamento da pró-caspase 9. Neste complexo (apoptossomo), a pró-caspase 9 dimeriza e ativa. A caspase 9 então ativa de forma proteolítica a pró-caspase 3. Retirado de Foo et al. Death begets failure in the heart. J. Clin. Invest. 115:565–571 (2005).

As caspases apoptóticas são classificadas como iniciadoras ou executoras dependendo do ponto de entrada na cascata apoptótica. As caspases iniciadoras (como as caspases 8 e 10 – via extrínseca; e caspases 9 e 2 – vias intrínseca) são as primeiras a serem ativadas em uma via de morte em particular, e assim, constituem o primeiro passo para ativação das caspases executoras (como caspase 3, 6 e 7). Uma vez que a atividade desregulada das caspases pode ser letal à célula, as caspases estão presentes como precursores latentes (zimogênios), as pró-caspases, necessitando de um evento de ativação (Boatright et al., 2003).

Os zimogênios das caspases iniciadoras estão presentes na célula como monômeros inativos. Estes zimogênios monoméricos necessitam de dimerização para então assumirem uma conformação ativa, e esta ativação é independente de clivagem. Em contraste, os zimogênios das caspases executoras estão presentes no citosol como dímeros inativos. Elas são ativadas pela proteólise limitada da ligação interdomínio por uma caspase iniciadora ou ocasionalmente por outras proteases sob circunstâncias específicas (Stennicke et al., 1999).

A mudança morfológica resultante deste processo, encontrada na maioria dos tipos celulares, primeiramente envolve a contração do volume celular e condensação do núcleo. Enquanto isso acontece, organelas intracelulares como mitocôndrias mantêm sua estrutura. À medida que a apoptose se processa, ocorre a retração da membrana plasmática e fragmentação nuclear. Finalmente, a própria célula se fragmenta para formar

corpos apoptóticos que são então fagocitados, na ausência de inflamação (Kang & Izumo, 2003).

1.2.2 APOPTOSE E FUNÇÃO CARDÍACA

A apoptose tem sido implicada em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos. Diversas evidências suportam a habilidade dos cardiomiócitos de ativarem e morrerem através deste processo em resposta a uma grande gama de estresses incluindo hipóxia, estresse oxidativo, infecção viral, excesso de estimulação adrenérgica e sobrecarga de trabalho (Sabbah & Sharov, 1998). Assim, o papel da apoptose nas doenças cardíacas tem atraído considerável atenção como uma causa potencialmente reversível da deterioração da função cardíaca.

A ocorrência de apoptose na IC em humanos foi inicialmente demonstrada por Narula et al (1996) e Olivetti et al (1997). Estes autores basearam suas conclusões na presença variável de miócitos positivos à TUNEL, sugestivo de fragmentação do DNA. Desta forma demonstrando que a apoptose está presente tanto na cardiomiopatia isquêmica quanto dilatada. Kanoh et al (1999), porém, ao avaliarem a ultra-estrutura de miócitos positivos a TUNEL observaram a ausência de características de morte celular por necrose ou mesmo por apoptose, levando a crer que a presença desta possa ser um indicativo de reparo ao DNA mais do que propriamente da presença de processo apoptótico.

A determinação de quando a apoptose tem um papel na patogênese ou ocorre como um evento paralelo associado aos estágios finais faz com que a sua significância na progressão da IC permaneça controversa. A apoptose tem

sido detectada no miocárdio em um grande número de patologias cardíacas incluindo hipóxia, isquemia seguida de reperfusão, infarto agudo do miocárdio, hipertrofia cardíaca e, em pacientes nos estágios finais de IC, sugerindo a importância da apoptose no desenvolvimento e progressão da doença cardíaca (Kunapuli et al., 2006).

Em contraste à isquemia-reperfusão, a IC é caracterizada por uma taxa muito baixa, porém anormal, nos níveis de morte de cardiomiócitos demonstrando taxas de 0,08 a 0,25% nos pacientes em estágio final de cardiomiopatia dilatada enquanto a taxa em pacientes saudáveis é de 0,001 a 0,002% (Hetts, 1998). Devido à natureza crônica da IC, mesmos níveis muito baixos de morte celular durante um longo período, por meses ou anos, podem ser significantes, uma vez que estes cardiomiócitos não estão mais se diferenciando (Kunapuli et al., 2006).

A apoptose de cardiomiócitos tem se mostrada estimulada de forma anormal no coração hipertrofiado de pacientes com hipertensão essencial sem evidências angiográficas de doença coronariana e função cardíaca normal. Gonzáles et al. (2002) documentaram um aumento da apoptose de cardiomiócitos em pacientes com IC crônica quando comparados a pacientes com hipertrofia cardíaca e função ventricular esquerda normal. Além disso, demonstraram um aumento no índice de apoptose e expressão de caspase 3 em corações de pacientes hipertensos com IC quando comparados a pacientes hipertensos com hipertrofia ventricular e pacientes normotensos. Baseado nestes dados é sugerido que a apoptose e perda de cardiomiócitos precedam a

disfunção ventricular e o seu aumento acompanhe o desenvolvimento de IC em pacientes hipertensos.

1.2.3 APOPTOSE NO REMODELAMENTO CARDÍACO

A IC geralmente apresenta um intervalo variável entre os danos iniciais e o seu desenvolvimento, assim como dos estágios iniciais para os finais. A progressão da doença, geralmente referida como remodelamento cardíaco, ocorre em adição às alterações hemodinâmicas, redução da capacidade ao exercício e ativação neuro-hormonal. Assim, este processo contínuo de remodelamento eventualmente contribui para a significativa mortalidade associada à IC (Haider et al., 2002).

O conceito de reversão do remodelamento ventricular tem sido descrito em inúmeras triagens clínicas conduzidas para avaliar a eficácia de inibidores neuro-hormonais, demonstrando que modificações neste processo podem alterar o prognóstico da IC. Os componentes do remodelamento ventricular incluem um período de hipertrofia dos miócitos seguida por uma redução absoluta do número de células, sugerindo que a hipertrofia cardíaca possa tornar os cardiomiócitos mais suscetíveis à apoptose (Guerdes et al., 1995).

A compensação inicial em vários substratos cardíacos que resultam na IC é acompanhada de ativação neuro-hormonal e de citocinas, que levam o miocárdio à hipertrofia. Em nível celular, há um aumento na síntese protéica e organização de sarcômeros com progressivo aumento em comprimento não acompanhado por aumentos proporcionais na largura dos cardiomiócitos, o que inicialmente parece reduzir o estresse de parede auxiliando na manutenção de um débito cardíaco adequado pode resultar em posterior dilatação. Esta

resposta hipertrófica está associada ao reaparecimento da expressão de genes fetais e indução de proliferação. Uma vez que os cardiomiócitos encontram-se terminantemente diferenciados à estimulação do desenvolvimento de hiperplasia pode ser considerado contra-produtivo e relacionado com a indução de apoptose (Haider et al., 2002).

Apesar desta relação entre hipertrofia e apoptose, é pouco provável que o crescimento cardíaco *per se* represente um sinal apoptótico. Em muitos tipos celulares ambas as respostas proliferativas e de sobrevivência são mediadas por fatores de crescimento. Em contraste, nos cardiomiócitos o crescimento hipertrófico está associado à ativação de diversas classes de neuro-hormônios e citocinas, poucos destes agentes claramente ligados à sobrevivência ou morte. No entanto, sabe-se que o mais importante estímulo para o crescimento cardíaco ainda é a sobrecarga hemodinâmica, provavelmente iniciando tanto a sinalização pró quanto anti-apoptótica, o que não exclui a possibilidade de que estas mensagens mistas possam ainda ser providas por outros tipos de agentes hipertróficos (Bishopric et al., 2001).

As respostas apoptóticas ou hipertróficas estão relacionadas tanto ao tipo de estímulo quanto à célula em questão. A hipertrofia fisiológica, como a induzida pelo exercício, deve ativar vias hipertróficas associadas exclusivamente à sobrevivência e manutenção da função. De forma oposta, a resposta resultante a estímulos patológicos deve ativar um fenótipo hipertrófico desfavorável possivelmente através da co-ativação de vias hipertróficas em paralelo com vias apoptóticas (Kang & Izumo, 2003). Assim, a questão que

permanece, é o que determina nos cardiomiócitos quando estas vias de sinalização estarão direcionadas a eventos pró ou anti-apoptóticos.

1.3 Estresse Oxidativo e Sinalização Celular

Tradicionalmente, o principal efeito patológico do estresse oxidativo tem sido referido como o dano e oxidação induzida pelos radicais livres que resultam na disfunção celular, necrose e/ou apoptose. Mais recentemente, no entanto, tem se tornado evidente que o estresse oxidativo e as espécies reativas de oxigênio (EROs) possam atuar de forma altamente específica na modulação de vias de sinalização intracelular na determinação deste fenótipo. Estes efeitos são de grande relevância não somente na IC, mas nos eventos precedentes envolvidos no remodelamento ventricular (Seddon et al., 2007).

Paradoxalmente, apesar de as EROs serem predominantemente implicadas no dano celular, elas ainda desempenham um papel fisiológico maior em diferentes aspectos da sinalização e regulação intracelular. Mittal & Murard (1977) proveram as primeiras evidências sugerindo efeitos biológicos favoráveis mediados pelas EROs. Em seus estudos relataram a ativação da guanilato ciclase e formação do segundo mensageiro cGMP, sendo estimulada pelo ânion superóxido através de seu derivado, o radical hidroxil. Efeitos similares também foram encontrados para o derivado peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (White et al., 1976; Mittal & Murad, 1977).

Diferentes tipos celulares, incluindo os cardiomiócitos, têm se mostrado capazes de produzir EROs incluindo radicais livres como o ânion superóxido, e radical hidroxil e compostos como H_2O_2 que pode ser convertido a radicais, participando tanto de processos fisiológicos quanto patológicos. O ânion

superóxido é originado de forma intracelular através da NADPH e xantina oxidase, desacoplamento da NOS e cadeia de transporte de elétrons, dando origem ao H_2O_2 pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD) e este, por sua vez, ao radical hidroxil pela reação de Fenton. Em contrabalanço, os cardiomiócitos também contam com um sistema antioxidante através da expressão e atividade de enzimas como a catalase, glutathione peroxidase e tioredoxina 1 (Trx1), assim como antioxidantes não enzimáticos: vitaminas A, C, β -caroteno entre outros (Hilfiker-Kleiner et al., 2006).

Esta produção de EROs está implicada na indução e manutenção de vias de transdução de sinais envolvendo o crescimento e diferenciação celular. Diversos aspectos fisiológicos envolvem os radicais livres e seus derivados, entre estes a regulação do tônus vascular, sensibilidade a pO_2 e regulação de funções controladas pelas concentrações de oxigênio, aumento da transdução de sinais de vários receptores de membrana e respostas ao estresse oxidativo que garantem a manutenção do estado redox. Diversas evidências têm suportado, assim, uma atuação destas como segundo mensageiros intracelulares, e esta premissa é especialmente verdadeira para espécies como o H_2O_2 , que é mais estável e difusível do que espécies como o ânion superóxido, mas também aplicável ao NO (Dröge, 2002).

O delicado balanço entre os efeitos benéficos e deletérios das EROs é o mais importante aspecto dos organismos vivos e é atingido através de um mecanismo conhecido como “regulação redox”. Este processo visa à proteção dos organismos contra o estresse oxidativo e mantém a “homeostase redox”

através do balanço entre a produção de EROs e sua remoção pelo sistema antioxidante (Mazur & Telser, 2007).

A homeostase redox intracelular ou a capacidade de tampão redox é sustentada principalmente pela glutathiona (GSH) e tioredoxina (Trx). A glutathiona (acoplamento 2GSH/GSSG) representa um dos maiores tampões redox celular e ainda pode ser um indicativo do estado redox da célula. Em condições de aumento de estresse oxidativo, o conteúdo intracelular de GSSG aumenta, por sua vez aumentando o conteúdo de proteínas com misturas dissulfeto. Um significativo número de proteínas envolvidas na sinalização que apresentam tióis críticos, como receptores, proteínas quinase e alguns fatores de transcrição podem ter suas funções alteradas pela formação de misturas dissulfeto. Desta forma, a GSSG, diferente de outras espécies, parece agir de forma não específica como uma molécula sinalizadora (Schafer & Buettner, 2001).

A possibilidade das EROs atuarem direta ou indiretamente como segundo mensageiros trouxe a utilização do termo sinalização redox para descrever os processos regulatórios nos quais o sinal é transmitido através de reações redox. A sinalização redox requer que o balanço redox seja interrompido tanto por um aumento na formação de EROs ou uma diminuição na atividade do sistema antioxidante. A indução deste desbalanço temporário representa a base deste processo. Assim, a demonstração fisiológica da sinalização redox envolve uma alteração temporária do estado redox intracelular na direção de condições mais oxidativas e mecanismos de sinalização que respondem a esta alteração tiol/dissulfeto, envolvendo fatores

de transcrição AP-1 e NF κ B, proteínas quinase, quinases da família Src, via das MAPK – JNK e p38, atividade de receptores tirosina quinase entre outros (Valko et al., 2007). Em condições patológicas, no entanto, a elevação anormal das concentrações de EROs pode levar a alterações permanentes na transdução de sinais e expressão gênica, típicas de estados patológicos (figura 3).

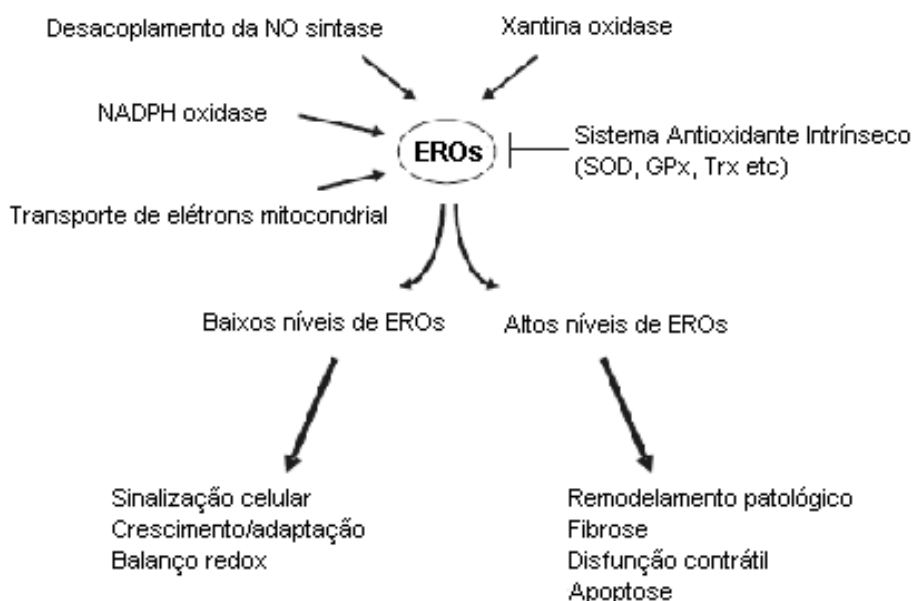


Figura 3: Esquema geral da geração de vias de sinalização pelas EROs e sistema antioxidante no coração. Baixos níveis de EROs estão envolvidos na sinalização cardíaca normal, hipertrofia adaptativa, e alterações na matriz. Em altos níveis levam ao remodelamento patofisiológico, apoptose e disfunção das câmaras. Retirado de Takimoto E & Kass DA. Role of Oxidative Stress in Cardiac Hypertrophy and Remodeling. Hypertension 2007; 49; 241-248.

A determinação de quando este efeito mediado pelo desbalanço redox terá um aspecto fisiológico ou patológico depende criticamente do tipo da ERO

em questão, a concentração e o sítio específico de produção, envolvendo assim diferentes espectros de ação. Acredita-se que em baixas concentrações, ou em período transitório, os mecanismos de transdução de sinal estariam direcionados à preservação da função do cardiomiócito e a expressão de genes relacionados à sobrevivência celular. No entanto, o aumento nas concentrações e o prolongamento da exposição levariam ao estresse oxidativo e efeitos prejudiciais subsequentes (Dhalla et al., 2000).

1.3.1 PAPEL DA SINALIZAÇÃO REDOX NO REMODELAMENTO CARDÍACO

Como demonstrado anteriormente, a hipertrofia cardíaca é uma componente chave na determinação do fenótipo de IC. Um crescente número de evidências tem implicado as vias de sinalização redox sensíveis, como as proteínas da família das MAPK (ERK1/2, JNK e p38), Akt e NF κ B, no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca tanto em resposta a estímulos neuro-hormonais quanto à sobrecarga de pressão crônica (Li et al., 2002).

Se por um lado, o estresse oxidativo severo é citotóxico a muitos tipos celulares, incluindo os cardiomiócitos, estresses menos severos podem representar um sinal anabólico. Diversos achados na literatura vêm demonstrando que a imposição de estresse moderado a cardiomiócitos induz hipertrofia. Por exemplo, em cultura de cardiomiócitos a imposição de estresse moderado pela adição de H₂O₂ é capaz de matar metade das células. No entanto, entre aquelas que sobrevivem observa-se um crescimento hipertrófico. Além disso, como descrito anteriormente, um número de estímulos hipertróficos geram um aumento da formação de EROs nos cardiomiócitos, sugerindo que a

formação de EROs por tais estímulos seja um processo necessário no desenvolvimento da resposta hipertrófica, assim como a atuação das EROs como segundo mensageiro neste processo. Esta hipótese é particularmente atrativa, uma vez que, pode ser relacionada com o aumento no consumo de oxigênio que ocorre durante a sobrecarga cardíaca levando a um aumento na taxa de produção de EROs e assim promovendo o crescimento (Sugden & Clerk, 2006).

Diversos estudos têm investigado os mecanismos pelos quais as EROs podem levar tanto a um fenótipo hipertrófico quanto apoptótico nos cardiomiócitos. As EROs têm se mostrado capazes de ativar a ERK1/2, p38, JNK e Akt em diversos tipos celulares, incluindo os cardiomiócitos. O papel destas vias de sinalização na hipertrofia cardíaca e apoptose suportam um modelo no qual distintas vias de sinalização apresentam sensibilidades diferenciais ao estresse oxidativo, e por este mecanismo levariam aos fenótipos referidos. Por exemplo, a ativação da ERK1/2 na ausência de JNK, p38 e Akt em miócitos ventriculares de ratos adultos após a estimulação de receptores α -adrenérgicos e aumento nas concentrações de EROs, leva à hipertrofia, na ausência de apoptose, achados similares são reportados na indução da formação de EROs em resposta a baixos níveis de estresse mecânico demonstrando um envolvimento concentração-dependente das EROs na ativação destas vias (Pimentel et al., 2001).

Resultados similares são encontrados em resposta à inibição do sistema antioxidante. Siwik et al (1999) demonstraram que o aumento sustentado dos níveis de superóxido causados pela inibição parcial ou total de SOD gera

profundos efeitos no crescimento e morte de cardiomiócitos neonatos *in vitro*. Estes efeitos estão associados à magnitude da inibição da SOD, onde um pequeno aumento no estresse oxidativo causado pela inibição parcial de SOD resulta em hipertrofia, enquanto que altos níveis de estresse oxidativo através da inibição total de SOD levam à apoptose.

Desta forma, acredita-se que a sobrevivência e morte celular dependem criticamente de seu estado redox. Enquanto que reservas suficientes de antioxidantes garantem um ambiente intracelular reduzido nos cardiomiócitos, a depleção destas reservas leva a uma alteração no estado redox celular. Tais mudanças no estado redox determinam quando os cardiomiócitos devem morrer, e se morrerem quando isto ocorrerá por apoptose ou necrose. Em última instância, a sobrevivência ou morte dependem da sinalização redox, regulação da transcrição de diversos genes redox sensíveis e de processos de reparo ao DNA (Das & Maulik, 2004).

1.4 Regulação da Oxidação de Proteínas e Sinalização Redox: Papel do Sistema Tioredoxina 1

Tanto as EROs quanto de nitrogênio podem reagir com proteínas, levando a modificações oxidativas pós-transcricionais. A natureza destas modificações oxidativas depende de uma variedade de fatores, incluindo a espécie oxidante em questão, a concentração e/ou o tempo de exposição, a localização intracelular, assim como a estrutura da proteína alvo. Apesar de o ambiente intracelular ser mantido em um estado relativamente reduzido, alguma modificação oxidativa deve ocorrer sob condições basais (Cooper et al., 2002).

Quando o estresse oxidativo aumenta, durante períodos transitórios pode induzir modificações oxidativas que são predominantemente reversíveis. Esta oxidação é capaz de levar à reversão da ativação ou inibição de moléculas alvo específicas (regulação redox), e assim qualificadas como eventos sinalizadores. De forma similar, altos níveis de estresse oxidativo, geram modificações oxidativas irreversíveis que podem resultar na perda de função pela proteína, degradação protéica ou o acúmulo de proteínas defeituosas. Tem se proposto que estas modificações irreversíveis desempenhem um papel central na patogênese de doenças neurodegenerativas, assim como nas doenças cardiovasculares associadas ao envelhecimento e aterosclerose (Kuster et al., 2006).

Para a maioria dos tipos de regulação protéica, é desejável que estes mecanismos sejam reversíveis. A modificação oxidativa de tióis pode ser revertida pela interação com outros agentes redutores que contenham tióis (ex: glutathiona), pela reação direta de troca de tióis ou por reações mediadas por estas enzimas. As principais enzimas capazes de reduzir tióis (detiolação) incluem o sistema glutaredoxina (Grx)/Grx redutase, Trx/Trx redutase e proteína dissulfeto isomerase (PDI). Todas estas enzimas compartilham de uma seqüência redox ativa Cys-X-X-Cys. Apesar de estas enzimas poderem agir de forma bidirecional, como um sistema redutor ou oxidante, Trx/Trx redutase e Grx/Grx redutase agem principalmente como antioxidantes por reduzirem proteínas dissulfeto e misturas dissulfetos, assim como por restaurarem outros sistemas redutores. Em contraste, a PDI age predominantemente como um oxidante pela formação de pontes dissulfeto que contribuem para o dobramento protéico (Debarbieux & Beckwith, 2000).

A Trx é uma classe de pequenas proteínas redox presentes em todos os organismos eucariotos e procariotos e essenciais para a viabilidade celular. O sistema Trx compreende a Trx, Trx redutase, e NADPH. A interação de proteínas cisteína oxidadas com seu grupamento redox ativo leva a redução destas proteínas e formação de Trx oxidada que por sua vez é reduzida novamente pela ação da Trx redutase na presença de NADPH. No entanto, a maior parte de suas ações antioxidantes é mediada pela Trx peroxidase, também conhecida como peroxiredoxina (Prx), que atua como substrato para a reação e assim participa diretamente na remoção de EROs. A Prx utiliza os grupamentos tióis como equivalentes redutores e os adiciona na redução direta do H_2O_2 à água. A forma reduzida da Prx é regenerada pela Trx em outro ciclo catalítico (Hoshino et al., 2007).

Atualmente, já foram encontradas três isoformas em mamíferos (Trx1, Trx2 e spTrx), dentre estas a mais amplamente estudada é a Trx1, uma proteína de 12kD localizada, em condições normais, principalmente no citoplasma. Apesar desta localização preferencial a Trx1 é capaz de ser translocada ao núcleo em condições de estresse, apesar de não apresentar nenhuma seqüência localizada no núcleo, pela interação com componentes do sistema de transporte nuclear. Além disso, a Trx1 pode ser secretada para o espaço extracelular sob condições de estresse e demonstra efeitos citoprotetores, anti-apoptóticos, atividade antiinflamatória, assim como efeitos tróficos atuando como um fator autócrino/parácrino. No entanto, não está claro como a Trx1 pode ser secretada e nem como pode transmitir seus sinais no espaço extracelular. Esta função extracelular da Trx1 pode ser considerada

única entre os vários antioxidantes, permitindo que esta atue de forma parácrina na redução da propagação de respostas deletérias (Sinclair, 2005).

Neste contexto, tem se proposto que a Trx1 não apresenta somente ações antioxidantes e de redução de moléculas redox sensíveis, mas também interage com várias proteínas como moléculas de sinalização intracelular e fatores de transcrição envolvidos no crescimento celular/apoptose e inflamação como NF κ B, AP-1, ASK-1 e PTEN. A interação é geralmente dependente do estado redox e localização da Trx1. Através da interação proteína-proteína, a Trx1 altera a atividade enzimática ou localização subcelular de proteínas específicas, assim afetando as várias funções celulares (Ago & Sadoshima, 2006).

1.4.1 EFEITOS POTENCIAIS DA TRX-1 NA DOENÇA CARDÍACA

Como demonstrado anteriormente, o aumento na produção de EROs desempenha um papel chave no desenvolvimento do remodelamento ventricular. Desta forma, antioxidantes como glutathione, Trx, SOD, catalase, Grx e Prx devem desempenhar um importante papel na atenuação do crescimento celular e manutenção da função ventricular. Enquanto, baixas doses de EROs são capazes de induzir a expressão de Trx1, altas doses levam a sua inativação através de modificações pós translacionais causados pelo desbalanço de EROs e NO. Assim, a reatividade da Trx1 frente a níveis variáveis de EROs deve afetar diferentemente as respostas intracelulares cardíacas como hipertrofia e apoptose (Ago & Sadoshima, 2006).

A Trx1 tem se mostrada envolvida em uma variedade de condições clínicas associadas com estresse oxidativo e inflamação. Alterações na Trx1

tem sido implicadas na formação de catarata, doença cardíaca isquêmica, câncer, HIV, artrite reumatóide e complicações associadas ao diabetes, doença hepática e renal. A região promotora do gene para Trx1 contém uma série de elementos responsivos ao estresse, como à oxidação, antioxidantes e choque térmico (World et al., 2006).

Em pacientes com síndrome coronária aguda e cardiomiopatia dilatada Kishimoto et al (2001) relataram um aumento significativo nos níveis plasmáticos de Trx quando comparados com indivíduos controle. Em adição os níveis de Trx plasmáticos se mostram correlacionado de forma positiva com a classe funcional cardíaca, proposta pela New York Heart Association (1964), e negativamente com a fração de ejeção ventricular esquerda. Estes resultados sugerem a possibilidade de uma associação entre a secreção de Trx e a severidade da IC. Apesar de os níveis teciduais exatos de Trx1 em pacientes com IC não estarem estabelecidos, acredita-se que estes devam acompanhar incrementos no estresse oxidativo dos cardiomiócitos, como uma realimentação negativa contra muitas respostas celulares. No entanto, não existem evidências de que a Trx1 seja capaz de suprimir a progressão da IC (Nordberg et al., 2001).

Em contraste com células cancerígenas, onde tem se mostrado um potente promotor do crescimento celular, nos cardiomiócitos a Trx1 é considerada um regulador negativo da hipertrofia e IC. Yamamoto et al (2003) desenvolveram um camundongo transgênico com expressão aumentada de Trx1 (Tg-Trx1) e outro com defeito na ação catalítica da Trx1 (Tg-Trx1-DN). A supressão endógena de Trx1 pelo aumento da expressão de Trx1-DN induz

hipertrofia cardíaca de base e um aumento na hipertrofia por constrição aórtica. Por outro lado, a hipertrofia cardíaca de base nunca foi observada no camundongo Tg-Trx1, e a hipertrofia induzida por coarctação aórtica foi significativamente reduzida. Estes achados indicam que a Trx1 é capaz de suprimir a hipertrofia cardíaca patológica. Os mecanismos envolvidos nos efeitos anti-hipertroficados da Trx1 parecem envolver a inibição da via Ras-MAPK, pela redução direta de tióis na Ras.

Contudo, a modulação de reguladores negativos de hipertrofia deve se tornar uma importante estratégia para o combate da progressão da IC. Diferente de outros reguladores a Trx1 se mostra capaz de inibir tanto o crescimento hipertrofico quanto a apoptose, o que deve ser ideal quando se considera tais agentes como terapêuticos em doenças cardíacas (Hardt et al., 2004).

Com isso, a Trx1 exerce efeitos anti-apoptóticos através de seus efeitos antioxidantes, e interação com proteínas regulatórias da apoptose como ASK1 e Akt. A forma reduzida de Trx1 inativa a ASK1, uma quinase que leva à ativação de p38 e JNK. Além disso, parece ser capaz de ativar a via da PI3K/Akt através da inibição de seu regulador negativo, a fosfatase e tensina homóloga (PTEN), que diretamente fosforila e inativa a Bad e pró-caspase 9 (Ago & Sadoshima, 2006)

A partir da discussão acima, a variedade de funções celulares reguladas pela Trx1 não somente como um agente anti-hipertrofico, mas também como um regulador da apoptose no coração envolve suas ações antioxidantes, assim como a interação e regulação de diversas vias de sinalização através da

interação direta com moléculas sinalizadoras intracelulares e fatores de transcrição. Através destas funções, a Trx1 parece prevenir o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca sob condições basais ou por estímulos patológicos emergido como uma molécula promissora na terapêutica clínica, uma vez que possui um pequeno tamanho e estrutura estável, podendo atuar tanto no meio intra quanto extracelular o que deve permitir sua administração diretamente no coração ou mesmo na circulação coronária (Hardt et al., 2004).

1.5 Compostos Polifenólicos da Uva Preta: Proposta Terapêutica

Desde o surgimento, e confirmação da real existência de um “Paradoxo Francês” (St. Leger, 1979; Frankel et al., 1993), não só o interesse de estudo, mas o entendimento dos mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos mediados pelo consumo de vinho tinto, e mesmo de outros produtos obtidos a partir de extratos de uva, cresceu exponencialmente. Ao ponto em que estes possam ser implicados como uma promissora proposta terapêutica em um grande número de doenças, não só sobre o sistema cardiovascular, mas virtualmente em todos os sistemas orgânicos.

A habilidade destes compostos de influenciarem diferentes estados patológicos tem sido atribuída à presença dos polifenóis, uma classe de flavonóides (Eastwood, 1999), que por sua estrutura, atribuí a estes compostos propriedades antioxidantes, através de sua capacidade redutora de doação de prótons e, possibilidade de por este efeito, influenciarem o estado redox e manterem a homeostase celular (Williams et al., 2004). No entanto, dado o metabolismo e concentrações *in vivo*, se tornou pouco provável que estes desempenhem nos sistemas biológicos uma ação antioxidante direta. De fato,

atualmente, os mecanismos envolvidos nos efeitos celulares mediados pelos flavonóides estão direcionados à interação destes com proteínas centrais específicas da cascata de sinalização celular ou ainda modulação da expressão e atividade de enzimas antioxidantes (Halliwell et al., 2000; Abd El Mohsen et al., 2002).

Neste contexto, os flavonóides e mais recentemente seus metabólitos, têm se mostrado capazes de atuar nas vias de sinalização associadas à via da PI3K/Akt, PKC e proteínas da família das MAPK. Suas ações inibitórias ou estimulatórias nestas vias, modulando alvos moleculares e expressão gênica celular, têm emergido como um importante mecanismo pelo qual estes compostos exercem seus efeitos benéficos em sistemas biológicos (Williams et al., 2004).

A utilização de resveratrol isolado parece induzir uma sinalização anti-apoptótica para a proteção do coração. Em artérias coronárias de suínos, o pré-tratamento agudo com resveratrol inibe significativamente a ativação da via das MAPK envolvida na sinalização mediada pela ET-1, demonstrando uma consistente redução na fosforilação de ERK1/2, JNK e p38 (El-Mowafy & White RE, 1999). Esta função anti-apoptótica é ainda observada em outros estudos, que demonstraram uma redução na apoptose de cardiomiócitos em modelo de isquemia/reperfusão pré-tratados com resveratrol (Imamura et al., 2002).

Kaga et al (2005) observaram em cultura de células endoteliais coronárias que a expressão da proteína redox Trx-1, e HO-1, aumentam de uma forma dose-dependente ao tratamento com resveratrol e que a indução do VEGF pelo resveratrol é dependente da atividade da HO-1. Em adição, neste

mesmo estudo, estes resultados foram posteriormente confirmados *in vivo*, através do pré-tratamento com resveratrol (1mg/kg/dia) de ratos submetidos à oclusão permanente da coronária anterior descendente esquerda, demonstrando que os efeitos envolvidos na cardioproteção e neovascularização devem ser mediados pela indução em concentrações fisiológicas da Trx-1, HO-1 e VEGF.

Apesar das crescentes demonstrações de que estes compostos são capazes de modular vias de sinalização ou até mesmo a atividade e expressão de enzimas antioxidantes, o mecanismo pelo qual estes efeitos são obtidos permanecem por ser elucidados. Recentemente se propôs que os compostos polifenólicos presentes no vinho tinto e extratos de uva, como suco de uva preta, devam modular importantes vias de sinalização através de uma interação redox sensível (Ndiaye et al., 2003; Ndiaye et al., 2004).

Recentemente, Anselm et al (2007) apresentaram dados indicando que o suco de uva preta é um potente vasodilatador das artérias coronárias por estimular a formação endotelial de NO e EDHF. Demonstrando ainda, que indução da formação intracelular de ânion superóxido, é um evento prévio e crucial à ativação da eNOS através da via da Src/PI3K/Akt. Assim, sugerindo que os efeitos benéficos do suco de uva preta no endotélio e função plaquetária em pacientes com doença coronariana, pelo menos em parte, se deva a indução do aumento da formação de fatores vasodilatadores a partir de uma ação pró-oxidante.

Um importante aspecto, no que diz respeito à cardioproteção mediada pelos compostos polifenólicos, é que seus efeitos parecem ser direcionados na

tentativa de limitar a progressão da doença cardíaca (Das & Maulik, 2006). Estes componentes podem agir de forma multidimensional, sendo capazes de inibir tanto a necrose quanto apoptose celular, e assim promover proteção contra doenças cardiovasculares, incluindo doença isquêmica, aterosclerose e arritmias cardíacas (Das et al., 2005; Das et al., 2006). Tanto em modelos agudos quanto crônicos a cardioproteção mediada por estes compostos é obtida através de um efeito pré-condicionante mais do que um efeito direto como obtido pela medicina convencional (Li et al., 2005).

Os mecanismos de adaptação geralmente envolvem mudanças na expressão gênica que resulta, entre outros eventos, no aumento das defesas antioxidantes, potencialização de vias de transdução de sinais através da inibição de sinais de morte e ativação de sinais de sobrevivência. Diferente de terapias medicamentosas, a adaptação cardíaca protege o coração por aumentar seus mecanismos de defesas endógenos (Das & Maulik, 2006). Pela analogia entre os mecanismos de ação envolvidos no pré-condicionamento isquêmico e a cardioproteção mediada pelo resveratrol (Das et al. 2006), a geração de pequeno estresse oxidativo pode ser um dos mecanismos envolvidos na melhora das respostas cardíacas mediadas pelo pré-tratamento com compostos polifenólicos observados em outros estudos *in vivo*.

2. HIPÓTESE

H0: O pré-tratamento com suco de uva preta não é capaz de gerar adaptação cardíaca e nem atenuar a progressão da hipertrofia compensatória à insuficiência cardíaca, em modelo de HAP induzida por MCT, através da regulação redox sensível de vias de sinalização envolvidas neste processo.

H1: O pré-tratamento com suco de uva preta é capaz de gerar adaptação cardíaca e atenuar a progressão da hipertrofia compensatória à insuficiência cardíaca, em modelo de HAP induzida por MCT, através da regulação redox sensível de vias de sinalização envolvidas neste processo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do pré-tratamento com suco de uva preta na modulação redox sensível do remodelamento ventricular direito em modelo de HAP induzido por MCT.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a resistência vascular pulmonar e consequências hemodinâmicas sobre o ventrículo direito;
- Analisar as alterações morfométricas cardíacas em resposta às alterações na resistência vascular pulmonar;
- Avaliar a função ventricular esquerda em resposta à sobrecarga de pressão sobre o VD;
- Avaliar o envolvimento do H_2O_2 na sinalização redox, no remodelamento ventricular direito em resposta à sobrecarga de pressão.
- Avaliar o imunconteúdo de Trx-1, p-Akt/Akt-total, p-Erk1/2/ERK1/2-total, p-JNK/JNK-total e caspase-3 por Western Blot e sua relação com o estado redox celular, alterações morfológicas e funcionais do ventrículo direito;

- Analisar os efeitos do tratamento crônico com suco de uva preta na adaptação cardíaca através dos parâmetros relacionados acima;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Experimentação Animal

4.1.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul no dia 08 de novembro de 2007 pelo processo 2007773 (sistema pesquisa universidade: 12771). O estudo foi desenvolvido de acordo com a Lei 6638, de 08 de maio de 1979, que estabelece normas para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de animais; dos Princípios Éticos na Experimentação Animal, formulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal; assim como àquelas contidas nos Princípios Internacionais Orientadores para a pesquisa Biomédica envolvendo Animais provenientes do Council for International Organizations of Medical Science (CIOMS) (Goldim, 1997).

4.1.2 CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL

O tamanho da amostra (n) foi calculado a priori, a partir de dados obtidos na literatura (Jones et al., 2002; Dudley et al., 2008). Para o cálculo do tamanho amostral foi utilizado o programa SigmaPlot versão 11.0, considerando-se um $\alpha=0,05$ e poder estatístico de 80% ($\beta=0,20$). O valor do n obtido para cada análise está indicado nos respectivos gráficos.

4.1.3 AMOSTRA

Foram utilizados ratos machos Wistar recém desmamados (21 dias de idade), pesando entre 35 e 40 gramas, adquiridos do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais, agrupados em caixas plásticas com medidas de 270 x 260 x 310 mm, cinco animais por caixa. Durante todo o tratamento os animais foram mantidos em condições padrão, temperatura média de 22°C e controle claro/escuro 12/12h com acesso à água e ração (Guabi – Indústria de Alimentos Alisul Ltda) “*ad libitum*”, com exceção das três horas precedentes à administração de água ou suco (10 mL/kg) através de sonda intragástrica (Osman et al., 1998).

4.1.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram estabelecidos quatro grupos experimentais, dois grupos controle: água e suco; e dois grupos MCT: água e suco.

- I. *controle água*: animais hígidos, recebendo água (10mL/kg) ao longo de todo o protocolo experimental.
- II. *MCT água*: animais com HAP, recebendo água (10mL/kg) ao longo de todo o protocolo experimental.
- III. *controle suco*: animais hígidos, recebendo suco de uva preta (10mL/kg) ao longo de todo o protocolo experimental.
- IV. *MCT suco*: animais com HAP, recebendo suco (10mL/kg) ao longo de todo o protocolo experimental.

4.1.5 MODELO EXPERIMENTAL

Para a indução de hipertensão arterial pulmonar, com 45 dias de vida, 3 semanas após o início do tratamento e peso de aproximadamente 180g, os ratos dos grupos HAP receberão dose única intraperitoneal de 60mg/kg de MCT (Crotaline – C240 SIGMA). Os ratos dos grupos controle receberão dose única de solução salina na mesma concentração dos grupos experimentais.

4.1.6 TRATAMENTO: SUCO DE UVA PRETA

O suco de uva utilizado no estudo foi o suco de uvas pretas 100% natural integral, produzido e engarrafado por Adega Casa de Madeira Ltda. Vale dos Vinhedos, 8º distrito, Bento Gonçalves – RS.

4.1.7 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram acompanhados pelo período de seis semanas. Ao longo deste, os animais recebiam diariamente, após período prévio de jejum (em torno de 3 horas), água ou suco no volume de 10mL/kg através de sonda intragástrica. Na terceira semana de tratamento, era induzida a HAP através de injeção única intraperitoneal de MCT ou salina (grupos controle), e tratados até a sexta semana, onde então foram realizadas as avaliações ecocardiográficas e hemodinâmicas, seguidas da coleta de tecidos para posteriores análises.

4.2 Análises

4.2.1 AVALIAÇÕES FUNCIONAIS

4.2.1.1 Análises Ecocardiográficas

Os animais foram avaliados por ecocardiografia antes da indução de HAP e 3 semanas após, ao final do protocolo. Para isto, foi utilizado o sistema EnVisor Philips (Andover, MA, USA), com transdutor de 12-13MHz, à 2cm de profundidade, imagem fundamental e harmônica.

- I. *Resistência vascular pulmonar:* A resistência vascular pulmonar foi avaliada através da razão AT/ET, que foi determinada pelo tempo de aceleração dividida pelo tempo de ejeção no perfil de fluxo da artéria pulmonar (Jones et al., 2002).
- II. *Dimensões do VE:* As áreas transversais (cm²) sistólicas e diastólicas finais foram obtidas pelo traçado da borda endocárdica em três níveis: basal (extremidade dos folhetos da valva mitral), medial (ao nível do músculo papilar) e apical (porção distal a partir do músculo papilar, mas anterior à curva final da cavidade) (Nozawa et al., 2006). Os diâmetros (cm) sistólicos (DS) e diastólicos (DD) finais também foram medidos nos três planos utilizando-se o Modo-M. O valor final para cada animal foi obtido através da média entre os três planos.
- III. *Função sistólica do VE* A mudança de área fracional (FAC) foi calculada como segue: $(FAC = \text{área diastólica} - \text{área sistólica} / \text{área diastólica})$. Volume sistólico do VE foi calculado como segue: $(\text{Volume diastólico final} - \text{volume sistólico final} / \text{volume diastólico final}) \times 100$; os volumes sistólicos e diastólicos finais da cavidade foram calculados utilizando-se o método de Simpson (Mercier et al.,

1982). O volume ejetado (VEj) foi determinado pela equação: $VEj = (\pi R)^2 \times VTI$, onde VTI é o tempo integral de velocidade do perfil do traçado do fluxo por Doppler, R é o raio da secção da artéria aorta e o valor de π é 3,1415. O débito cardíaco foi obtido pela equação: $DC = VEj \times \text{Frequência cardíaca (FC)}$. A fração de encurtamento (FEnc) foi obtida pela equação: $FEnc = DD - DS/DD \times 100$.

IV. *Função diastólica do VE*: A função diastólica do VE foi determinada através da razão E/A, obtida pelo pico de velocidade da onda E dividida pelo pico de velocidade da onda A no perfil de fluxo diastólico da mitral (Cury et al., 2005).

V. *Índice de performance do miocárdio (IPM)*: o IPM foi obtido através do perfil do traçado do fluxo por Doppler como expresso pela equação que segue: $IPM = (\text{tempo de fluxo da mitral} - \text{tempo de ejeção aórtico})/\text{tempo de ejeção aórtico}$ (Cury et al., 2005).

VI. *Massa do VE*: A massa (g) foi calculada de acordo com a equação estabelecida pela American Society of Echocardiography: $M(g) = 1.04[(\text{Diâmetro diastólico} + \text{Espessura diastólica da parede anterior} + \text{Espessura diastólica da parede posterior}) - \text{Diâmetro diastólico}]^3$ (Litwin et al., 1994).

4.2.1.2 Análises Hemodinâmicas

Para a avaliação de parâmetros hemodinâmicos, os animais foram anestesiados com cetamina (90mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg) administradas intraperitonealmente. A veia jugular direita foi exposta e uma cânula (cateter de

polietileno PE-50) foi implantada e introduzida até o átrio e VD pela veia jugular e até a aorta pela carótida. A pressão sistólica ventricular direita (PSVD), a pressão diastólica final ventricular direita (PDFVD) e a pressão aórtica média (PAM) 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 pressão foram digitalizados (Windaq – Data Acquisition System, PC) com frequência de amostragem de 1000 Hz, expressos em mmHg.

4.2.2 AVALIAÇÕES MORFOMÉTRICAS

4.2.2.1 Peso Corporal

O registro do peso dos animais foi realizado semanalmente durante todo o período do protocolo. A aferição foi realizada através da utilização de balança Marte específica para animais de pequeno porte.

4.2.2.2 Índice de Hipertrofia Cardíaca e de Câmaras

Ao final do protocolo, os animais ainda anestesiados foram sacrificados por deslocamento cervical. O tórax foi aberto e os órgãos extraídos. O coração foi rapidamente retirado e os átrios separados dos ventrículos. O VD e VE+septo foram dissecados e pesados. Para a análise da hipertrofia cardíaca e hipertrofia das câmaras individualmente, foi calculada a razão entre o peso do tecido (g) e o peso corporal do animal (g) multiplicado por 10^3 (Farahmand et al., 2004).

4.2.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

4.2.3.1 Peróxido de Hidrogênio

O método utilizado está baseado na oxidação do vermelho de fenol pelo H_2O_2 mediado pela peroxidase de rabanete, resultando num produto que absorve em 610 nm. As fatias do tecido cardíaco foram incubadas por 60 min. em tampão fosfato 10mM (NaCl 140 mmol/L e dextrose 5 mmol/L). O sobrenadante foi coletado e adicionado na solução tampão de vermelho de fenol 0,28 mmol/L e peroxidase de rabanete 8,5 U/mL. Após o intervalo de 10 minutos, adicionou-se NaOH 1mol/L e efetuada a leitura a 610 nm. O resultados foram expressos em nmoles de H_2O_2 por mg de proteína (Pick & Keisari, 1980).

4.2.4 ANÁLISE DO IMUNOCONTEÚDO PROTÉICO POR WESTERN BLOT

Após o fim dos experimentos as amostras de coração a serem analisadas foram imersas imediatamente após a extração em nitrogênio líquido e armazenado a $-80^{\circ}C$.

Para a separação eletroforética das proteínas, as amostras de tecido foram descongeladas em tampão Tris-EDTA gelado (Tris HCl 100mmol/L, EDTA 5mmol/L, $ph=7,4$) e homogeneizados com a utilização do homogeneizador Politron em dois pulsos de 15 segundos com intervalos de 10 segundos. Foram adicionados ao tampão aprotinina (10-g/ml) e fluoreto de fenilmetilsulfonil ($20\mu\text{mol/L}$), para impedir a proteólise. As concentrações de

proteína foram analisadas através da técnica descrita por Bradford (1976), e utilizadas para normalizar a quantidade de proteína carregada nos géis.

Foram aplicadas 80µg de proteína a eletroforese de gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando 15% (P/V) de gel separador e 5% (P/V) de gel fixador. As proteínas foram, então, transferidas para uma membrana de nitrocelulose usando tampão Towbin modificado, contendo Tris 20mmol/L, glicina 150mmol/L, metanol 20% (V/V), SDS 0,02% (P/V) (pH=8,3) através do método de tanque, em uma cuba de transferência resfriada. Após os sítios de proteínas inespecíficas foram bloqueados através de 1 hora de incubação com solução bloqueadora (10% (P/V) de albumina) em tampão Tris salina 0,1% (P/V), tween-20.

As membranas foram incubadas com diferentes anticorpos para a imunodeteccção de proteínas específicas. Utilizou-se os seguintes anticorpos primários mouse anti-Trx1, rabbit anti-p-Akt, rabbit anti-Akt-total, rabbit anti-p-ERK1/2, rabbit anti-ERK1/2-total, goat anti-p-JNK, rabbit anti-JNK-total (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e rabbit anti-caspase-3 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). Os anticorpos primários foram detectados usando os seguintes anticorpos secundários: “rabbit anti-mouse”, “goat anti-rabbit” e “rabbit anti-goat horseradish peroxidase” (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). As diferentes proteínas foram avaliadas na mesma membrana após “stripping”.

As membranas foram reveladas por luminescência ao ECL (*in home*). Os filmes autorradiográficos foram quantitativamente analisados no densitômetro

de imagem (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences, Europe, IT). Os pesos moleculares das bandas de proteínas foram determinados em referência a um marcador de peso molecular (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). Os resultados de cada membrana foram normalizados pelo método de Ponceau (KLEIN et al., 1995).

4.2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Após a determinação de todos os parâmetros relacionados anteriormente, foram calculadas as médias±desvios padrões para cada grupo. A comparação entre dados paramétricos foi feita através da análise de variância de duas vias (two-way ANOVA), com o teste complementar de Student Newman Keuls. A correlação entre as variáveis foi feita através do teste de Correlação de Pearson. A significância estatística foi definida como um $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Resistência vascular pulmonar na HAP induzida por MCT

Como descrito, a HAP é marcada por um aumento na resistência vascular pulmonar que pode ser determinada de forma não invasiva através da técnica de Doppler pulsátil. Como observado na figura 4, entre os grupos controle (figura 4A e 4B), o fluxo da artéria pulmonar tem o formato de uma abóbada com o pico na metade da sístole, sendo ainda conhecida como modelo tipo I do fluxo da pulmonar. Em contraste, entre os animais do grupo MCT (figura 4C e 4D) o padrão da onda se modifica, o pico de velocidade se torna mais agudo, e como consequência do aumento da resistência, passa a ocorrer precocemente, podendo ainda ser considerado um indicativo de HAP moderada.

A avaliação da razão entre tempo de aceleração (AT) e tempo de ejeção (ET) do fluxo através da artéria pulmonar tem se mostrada correlacionada de forma inversa com a resistência vascular sendo extensamente utilizada para a determinação precoce de alterações neste leito. De acordo com isso, a HAP induzida por MCT está associada com uma redução significativa neste parâmetro ($p < 0,001$) como mostrado na figura 5. Em adição, o tratamento crônico com suco de uva se mostrou capaz de atenuar de forma significativa as variações na resistência vascular pulmonar ($0,190 \pm 0,025$ vs $0,151 \pm 0,027$; $p < 0,05$).

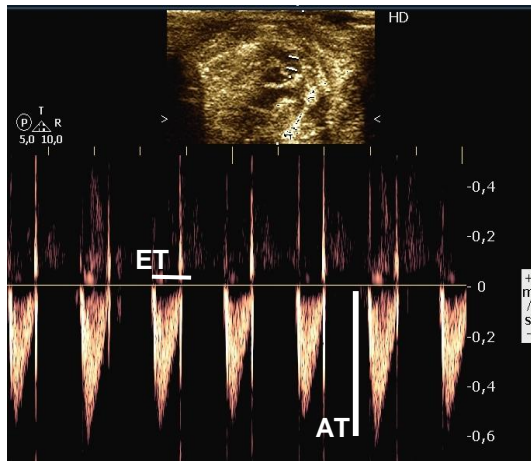
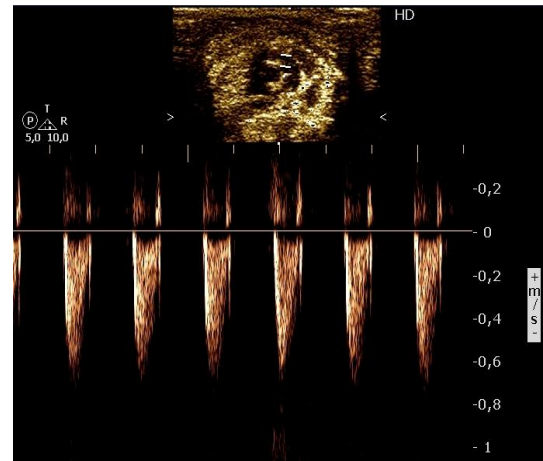
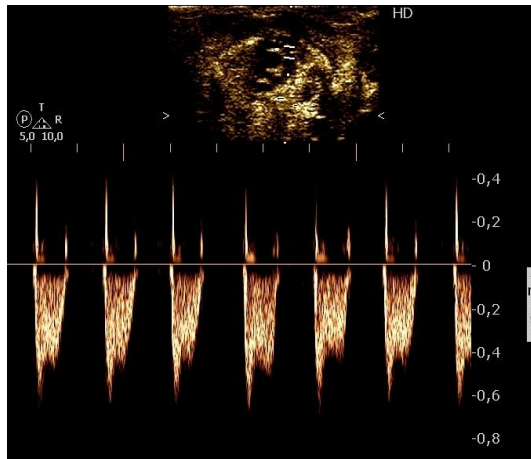
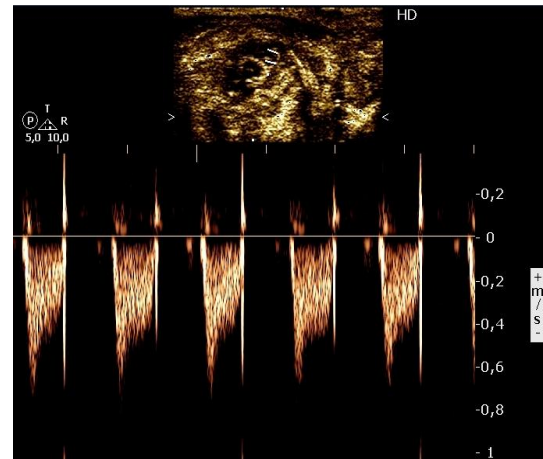
A**B****C****D**

Figura 4: Imagem representativa dos registros ecocardiográficos por Doppler Pulsátil do fluxo na artéria pulmonar três semanas após a indução de HAP por MCT. Na primeira imagem apresentamos o eixo de avaliação do tempo de ejeção (ET) e tempo de aceleração (AT) do fluxo pela artéria pulmonar. Onde, A = grupo controle água; B = grupo controle suco; C = grupo MCT água; e D = grupo MCT suco.

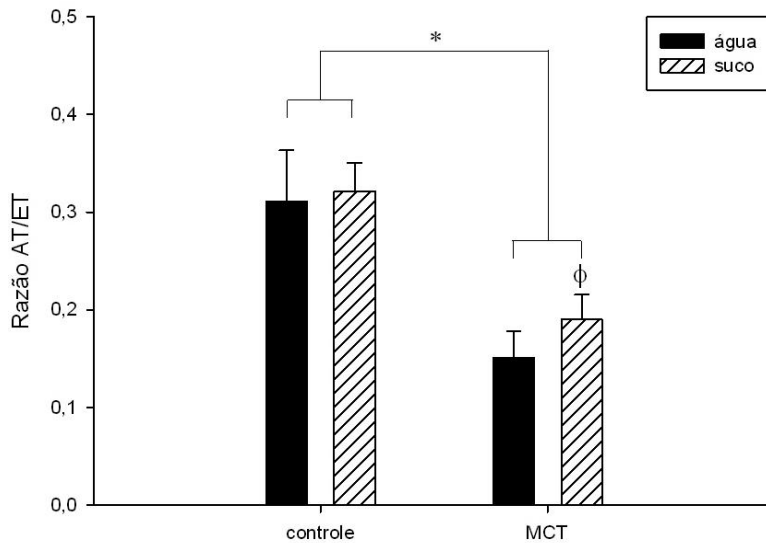


Figura 5: Efeitos do tratamento com suco de uva preta na razão AT/ET nos distintos grupos. Valores expressos na forma de $M \pm DP$, $n=8-10$ animais/grupo, obtidos ao final do protocolo experimental. Onde *, $p < 0,001$ controle vs MCT; e ϕ , $p < 0,05$ MCT água vs MCT suco.

5.2 Avaliação hemodinâmica do ventrículo direito (VD) em resposta à resistência vascular pulmonar

De acordo com as observações anteriores, o modelo de HAP induzido por MCT apresenta um significativo aumento tanto na pressão sistólica (PSVD) quanto na pressão diastólica final do VD (PDFVD) ($P < 0,001$), correlacionadas positivamente ($r=0,794$; $p=0,0000$). Apesar disto, como observado na figura 6A, o tratamento crônico com suco de uva é capaz de atenuar o aumento na PSVD ($37,19 \pm 2,05 \text{ mmHg}$ vs $44,05 \pm 7,03 \text{ mmHg}$; $p < 0,05$) assim como na PDFVD ($7,12 \pm 0,30 \text{ mmHg}$ vs $8,38 \pm 0,89 \text{ mmHg}$; $p < 0,05$), figura 6B.

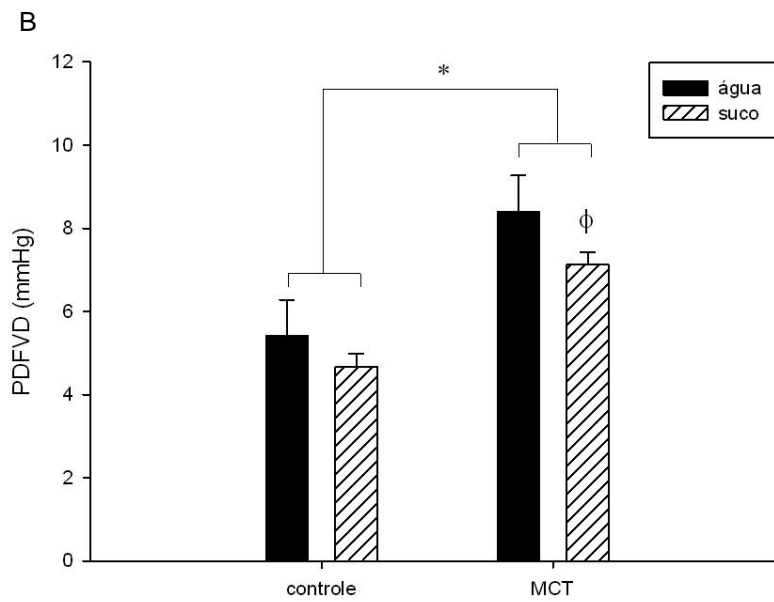
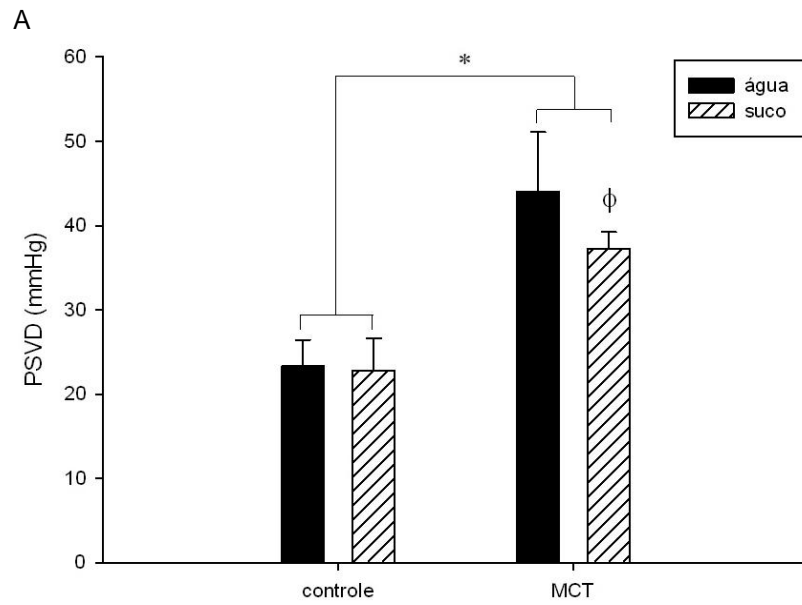


Figura 6: Efeito do tratamento com suco de uva preta (A) na pressão sistólica do VD (PSVD) e (B) pressão diastólica final do VD (PDFVD). Valores expressos na forma de $M \pm DP$, $n=5-7$ animais/grupo, obtidos ao final do protocolo experimental. Onde *, $p < 0,001$ controle vs MCT; e ϕ , $p < 0,05$ MCT água vs MCT suco.

5.3 Índices de hipertrofia cardíaca e ventricular

Como observado na tabela 1, a HAP induzida por MCT leva ao aumento do índice de hipertrofia cardíaca, marcada pelo aumento no índice de hipertrofia do VD, mas não do VE. Este parâmetro se mostra inversamente correlacionado com a razão AT/ET ($r = -0,775$; $p < 0,0000$), como mostrado na figura 7. Apesar disso, o tratamento com suco de uva não atenuou este parâmetro.

Tabela 1: Análise dos índices de hipertrofia cardíaca e ventricular dos distintos grupos ao final do protocolo experimental.

	Grupos			
	Controle		MCT	
	Água	Suco	Água	Suco
Peso corporal (g)	254 ±20	256±31	199±25 ^φ	219±34 [*]
Hipertrofia Cardíaca (mg/gx10 ³)	2,59±0,33	2,57±0,27	2,85±0,29 [*]	2,86±0,32 ^δ
Hipertrofia do VE (mg/g x10 ³)	2,08±0,19	2,07±0,19	2,09±0,28	2,14±0,31
Hipertrofia do VD (mg/g x10 ³)	0,50±0,15	0,50±0,09	0,76±0,14 ^φ	0,76±0,14 ^φ

Onde, VE = ventrículo esquerdo; VD = ventrículo direito. Dados apresentados na forma de $M \pm DP$, $n=8-10$ animais/grupo. Onde, * = $p < 0,001$ MCT vs controle; ϕ = $p < 0,0001$ MCT vs controle; δ = $p < 0,05$ MCT vs controle; θ = $p < 0,001$ MCT suco vs MCT água.

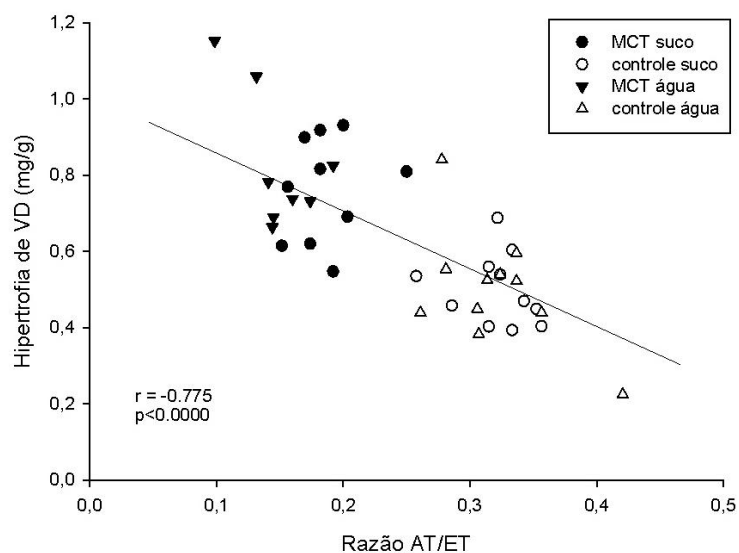


Figura 7: Correlação entre variações da resistência vascular pulmonar, representadas pela Razão AT/ET e índice de hipertrofia do ventrículo direito (VD).

5.4 Função ventricular esquerda na HAP induzida por MCT

Apesar da demonstração anterior de hipertrofia ventricular direita, nenhum dos parâmetros relacionados à função ventricular esquerda se mostrou alterado, tabela 2. Estes dados demonstram a preservação da função diastólica do VE determinada pela razão E/A do fluxo pela mitral, bem como função sistólica deste definido pelo débito cardíaco, fração de ejeção, mudança de área fracional, fração de encurtamento e ainda índice de desempenho do miocárdio.

Tabela 2: Avaliação da função ventricular esquerda por ecocardiografia através da avaliação em modo 2D e fluxo por Doppler nos distintos grupos ao final do protocolo experimental.

	Grupos			
	Controle		MCT	
	Água	Suco	Água	Suco
	Modo 2D			
Massa (g)	0,301±0,045	0,296±0,044	0,297±0,034	0,286±0,047
Diâmetro Sistólico (cm)	0,293±0,060	0,302±0,064	0,279±0,04	0,335±0,068
Diâmetro Diastólico (cm)	0,656±0,060	0,670±0,057	0,632±0,040	0,667±0,080
Fração de Ejeção (%)	79,315±2,963	79,937±5,705	80,858±5,832	78,957±5,677
Mudança de Área Fracional (%)	0,774±0,037	0,772±0,056	0,795±0,057	0,783±0,041
Fração de encurtamento (%)	55,695±6,355	55,231±6,843	55,842±6,843	52,348±6,821
	Doppler			
Frequência Cardíaca (bpm)	226±21	222±18	210±34	216±25
Débito Cardíaco (ml/min)	328,629±53,575	339,496±53,203	300,119±39,866	327,981±77,055
Onda E (m/sec)	1,500±0,231	1,465±0,175	1,441±0,079	1,563±0,168
Onda A (m/sec)	0,811±0,128	0,749±0,122	0,783±0,097	0,766±0,106
Tempo de desaceleração da mitral (msec)	0,045±0,008	0,049±0,010	0,052±0,006	0,050±0,007
Razão E/A	1,900±0,164	1,992±0,374	1,866±0,246	2,078±0,350
Índice de desempenho do miocárdio	0,285±0,077	0,241±0,081	0,330±0,083	0,294±0,090

Dados apresentados na forma de $M \pm DP$, $n=8-10$ animais/grupo, sem diferença significativa entre os grupos.

5.5 Determinação das concentrações de H₂O₂ no ventrículo direito

Como observado na figura 8, a HAP induzida por MCT está associada a um aumento nas concentrações de H₂O₂ teciduais 0,919±0,253 vs 0,653±0,115 (p<0,01), comparação entre o grupo MCT água e controle água. No entanto, nos grupos tratados com suco de uva as variações nas concentrações de H₂O₂ ocorrem de forma inversa. Enquanto que nos animais controle, o suco está associado a aumentos na concentração de H₂O₂ 0,895±0,259 vs 0,653±0,115 (p<0,05), diante do modelo, o tratamento é capaz de reverter significativamente o aumento descrito anteriormente 0,919±0,253 vs 0,697±0,158 (p<0,05).

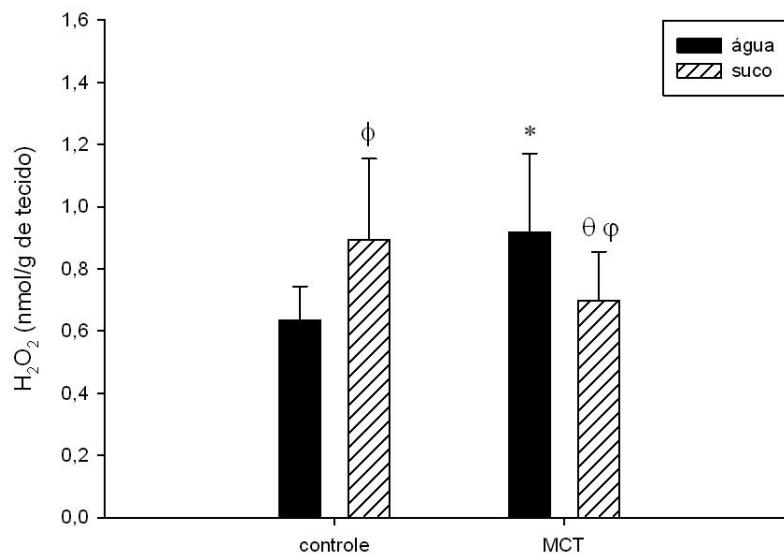


Figura 8: Determinação das concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em ventrículo direito. Dados apresentados na forma de M±DP, n=8-10 animais/grupo. Onde φ, p<0,05 controle suco vs controle água; *, p<0,01 MCT água vs controle água; θ, p<0,05 MCT suco vs controle suco; φ, p<0,05 MCT suco vs MCT água.

5.6 Análise do imunoconteúdo de Trx1 no ventrículo direito

Como demonstrado na figura 9, a expressão protéica de Trx1 é influenciada de forma significativa pela HAP ($p=0,002$). Em adição, o tratamento com suco de uva é capaz de estimular a expressão desta, independente do modelo entre os animais controle $112,70\pm 23,60$ vs $74,45\pm 23,77$ ($p<0,001$) demonstrando ainda nos animais MCT a somação entre seu efeito isolado e o modelo $140,35\pm 21,25$ vs $100,65\pm 22,84$ ($p<0,01$).

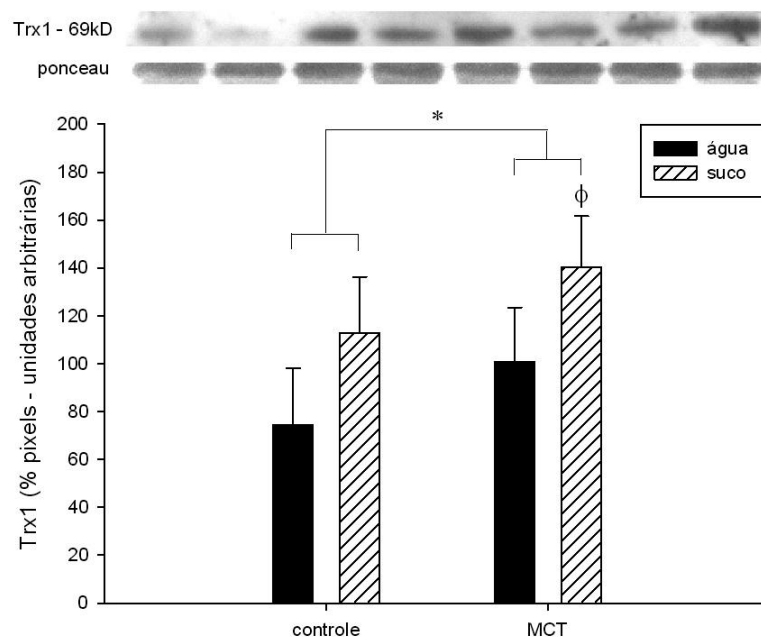


Figura 9: Análise do imunoconteúdo de Trx1 por Western Blot em homogeneizado de ventrículo direito. As imagens representativas desta análise são apresentadas acima, duas bandas para cada grupo na ordem que aparecem no histograma. Dados apresentados na forma de $M\pm DP$, $n=7-8$ animais/grupo. Onde, *, $p=0,002$ MCT vs respectivos controles; ϕ , $p<0,01$ MCT suco vs MCT água.

5.7 Análise da ativação de vias adaptativas no ventrículo direito: ERK1/2 e Akt

As análises do imunoconteúdo de ERK1/2 e Akt estão apresentadas na figura 10 e figura 11, respectivamente. Não observamos qualquer alteração na imunodeteccção das proteínas totais. De forma similar aos achados relacionados ao H₂O₂, o grupo MCT água apresentou um aumento na ativação de ERK1/2 quando comparado a seu respectivo controle, $117,042 \pm 16,671$ vs $81,495 \pm 21,824$ ($p < 0,05$), o mesmo observado em reposta ao tratamento com suco de uva nos animais controle $124,927 \pm 13,317$ ($p = 0,003$). No entanto, o suco foi capaz de reverter de forma significativa a ativação de ERK1/2 descrita anteriormente para valores próximos aos basais, $62,465 \pm 12,021$ ($p < 0,001$).

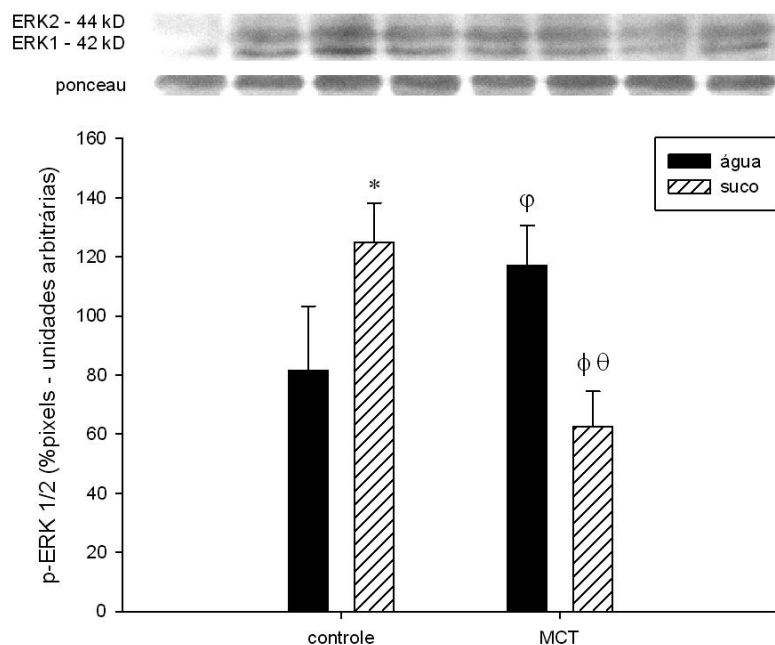


Figura 10: Análise do imunoconteúdo de p-ERK1/2 por Western Blot em homogeneizado de ventrículo direito. As imagens representativas desta análise são apresentadas acima, duas bandas para cada grupo na ordem que aparecem no histograma. Dados apresentados na

forma de $M \pm DP$, $n=4$ animais/grupo. Onde, $*$, $p=0,003$ controle suco vs controle água; φ , $p<0,05$ MCT água vs controle água; ϕ , $p<0,001$ MCT suco vs controle suco; θ , $p<0,001$ MCT suco vs MCT água.

Ainda, não foram observadas quaisquer alterações na ativação da Akt, no que diz respeito tanto ao modelo quanto ao tratamento com suco de uva preta.

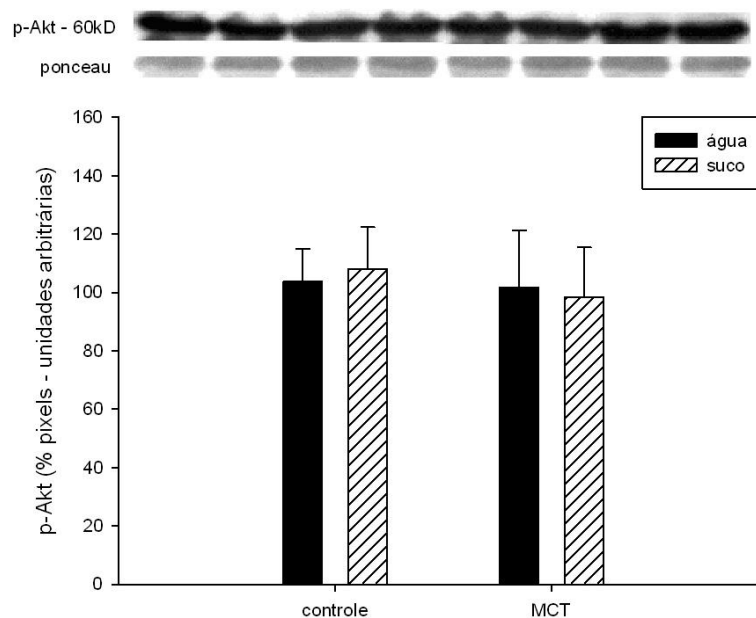


Figura 11: Análise do imunoconteúdo de p-Akt por Western Blot em homogeneizado de ventrículo direito. As imagens representativas são apresentadas acima, duas bandas para cada grupo na ordem que aparecem no histograma. Dados apresentados na forma de $M \pm DP$, $n=7-8$ animais/grupo, sem diferença significativa entre os grupos.

5.8 Análise da ativação de vias não-adaptativas no ventrículo direito: JNK e caspase-3

Apesar de não observamos alterações na JNK-total ou JNK ativada entre os grupos, figura 12, a hipertrofia ventricular direita está associada com o aumento do imunocnteúdo de caspase-3 quando comparado aos seus respectivos controles ($p < 0,001$). Ao avaliarmos os efeitos do tratamento com suco de uva preta, observamos que este foi capaz de atenuar esta alteração induzida pelo modelo ($118,38 \pm 15,10$ vs $101,36 \pm 12,54$; $p < 0,05$). Em adição, os níveis de caspase-3 estão negativamente correlacionados com a razão AT/ET ($r = -0,831$; $p < 0,0000$).

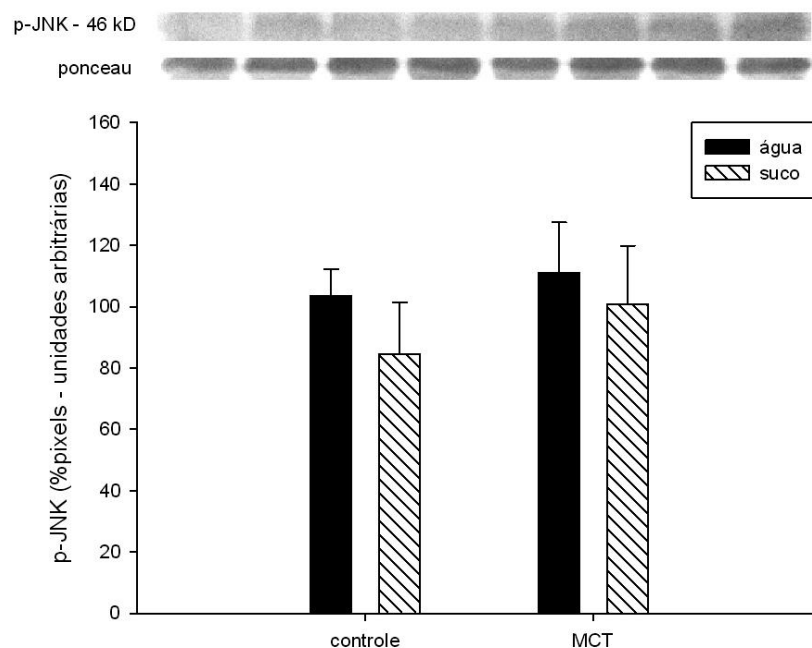


Figura 12: Análise do imunocnteúdo de p-JNK por Western Blot em homogeneizado de ventrículo direito. As imagens representativas são apresentadas acima, duas bandas para cada

grupo na ordem que aparecem no histograma. Dados apresentados na forma de $M \pm DP$, $n=4$ animais/grupo, sem diferença significativa entre os grupos.

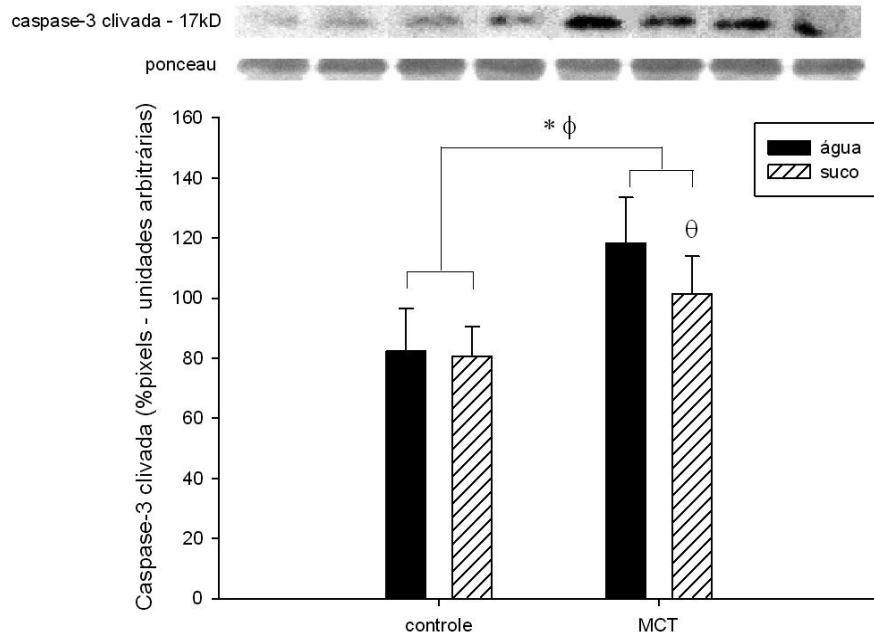


Figura 13: Análise do imunocnteúdo de caspase-3 por Western Blot em homogeneizado de VD. As imagens representativas são apresentadas acima, duas bandas para cada grupo na ordem que aparecem no histograma. Dados apresentados na forma de $M \pm DP$, $n=5-7$ animais/grupo. Onde, *, $p < 0,001$ MCT água vs controle água; ϕ , $p < 0,05$ MCT suco vs controle suco; θ $p < 0,05$ MCT suco vs MCT água.

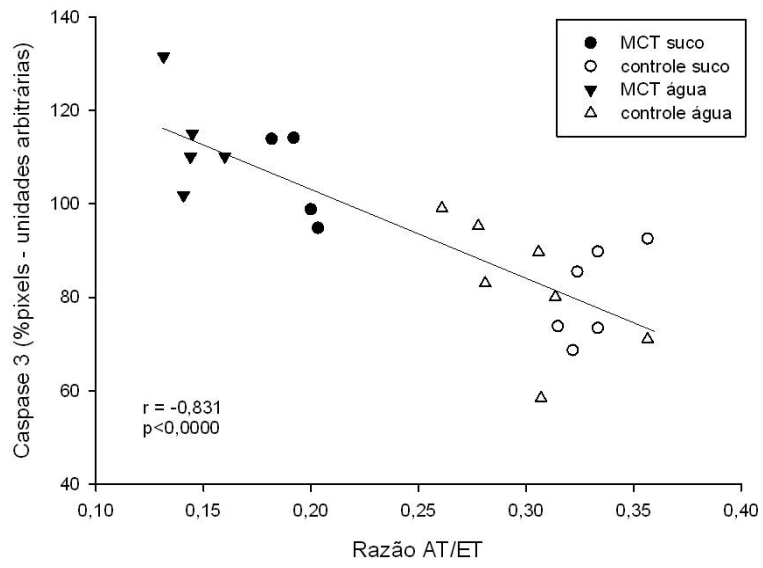


Figura 14: Correlação entre variações da resistência vascular pulmonar, representadas pela razão AT/ET e caspase 3 em VD.

6. DISCUSSÃO

O modelo de HAP induzido por MCT tem sido um dos focos de estudo do nosso laboratório ao longo dos últimos anos. Estudos anteriores avaliando a utilização dos compostos polifenólicos presentes no suco de uva como proposta terapêutica demonstraram que este foi capaz de promover um aumento na biodisponibilidade de NO na vasculatura pulmonar, refletindo em melhora do quadro de *Cor pulmonale* (Lehenbauer-Lüdke, 2007). No presente estudo, utilizando-se a análise ecocardiográfica, a qual permite uma avaliação funcional mais completa da função vascular e cardíaca, determinamos a repercussão funcional dos achados anteriores, qual seja a atenuação do aumento da resistência arterial pulmonar.

No entanto, além dos conhecidos efeitos em termos vasculares, foi o objetivo central de nosso estudo determinar se o tratamento com suco de uva preta poderia promover efeitos adicionais sobre a própria musculatura cardíaca do VD, neste modelo experimental. Na ocorrência destes efeitos, determinar o envolvimento da modulação redox de vias de sinalização envolvidas no processo de remodelamento ventricular direito em resposta à sobrecarga de pressão.

Uma vez que o estímulo patogênico inicial para o desenvolvimento do *Cor pulmonale* se encontra localizado na própria vasculatura pulmonar, ao nível das arteríolas (Rabinovitch, 2008), avaliamos se estas alterações poderiam ser detectadas através das medidas por Doppler pulsátil. De acordo com nossos resultados, o estabelecimento do modelo experimental após três semanas está

associado à modificação do padrão da onda de fluxo pela artéria pulmonar, com o pico de velocidade antecedendo a metade da sístole e associado ao aparecimento de um segundo pico ou “entalhe” ao final do período de ejeção, podendo representar um indicativo de que, neste período, a HAP encontra-se em um estágio moderado em ambos os grupos (Uehara, 1993).

Diversos estudos têm demonstrado os efeitos benéficos do consumo regular de compostos polifenólicos derivados da uva preta sobre o sistema vascular, no que diz respeito à prevenção da migração e proliferação de células musculares lisas (Iijima et al., 2000; Iijima et al., 2002). Em adição, parte das ações destes compostos sobre as células endoteliais pode ser derivada do aumento da formação de NO e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), dois dos principais fatores envolvidos no controle da homeostase vascular (Ndiaye et al., 2003; Ndiaye et al., 2005). Uma vez que o aumento do tônus vasomotor e o remodelamento crônico dos vasos pré-capilares estão envolvidos nos mecanismos patogênicos da HAP em humanos e no modelo induzido por MCT em ratos (Huxtable, 1990), avaliamos se o tratamento com suco de uva poderia modular as alterações na resistência vascular pulmonar.

Em nossas observações, utilizamos a razão entre o tempo de aceleração e o tempo de ejeção (razão AT/ET) do fluxo através da artéria pulmonar como parâmetro indicativo de resistência vascular pulmonar (Jones et al., 2002). A demonstração da redução do tempo de aceleração associada ao aumento do tempo de ejeção, nos grupos MCT em relação a seus controles, revela a redução da capacitância dos vasos pulmonares ao fluxo, provavelmente devido ao remodelamento deste leito, mas também associado à

alteração na produção endógena de moléculas vasoativas que podem estar associadas à progressão desta doença (Xu, 2004). Apesar disso, quando comparados os grupos MCT entre si, o grupo MCT suco apresenta uma atenuação significativa na redução da capacitância dos vasos pulmonares em relação ao grupo MCT água.

O impacto do aumento da resistência vascular pulmonar sobre a função ventricular direita foi confirmado pela avaliação hemodinâmica através de cateterismo cardíaco, revelando o aumento na pressão sistólica do VD (PSVD) nos grupos MCT. Em adição, o aumento na pressão diastólica final (PDFVD) se correlaciona positivamente com o grau de elevação da PSVD. Estes dados são consistentes com achados clínicos em pacientes com esta patologia e resultados demonstrados por outros autores neste modelo (Bossone et al., 1999; Maruyama et al., 2007). Além disso, a atenuação das variações na PSVD e PDFVD pelo tratamento com suco de uva sugere a possibilidade de que a manutenção da biodisponibilidade de NO na vasculatura pulmonar, observada por Lehenbauer-Lüdke (2007), com mesmo delineamento experimental, possa estar envolvida na atenuação da resistência vascular pulmonar e consequentemente nas respostas hemodinâmicas observadas no período avaliado. Pichardo et al (1999), nesta mesma janela temporal, demonstraram que o aumento na PSVD possa prover uma mecanismo adaptativo, mesmo na presença de uma PDFVD aumentada, para a manutenção da função ventricular direita frente a variação na resistência vascular pulmonar. Posteriormente, Farahmand et al (2004), avaliando as alterações na função ventricular direita durante a progressão da HAP induzida por MCT, revelaram que mesmo em um período prévio, 2 semanas após a indução, ainda na ausência de indicativos de

IC direita, tanto a PSVD quanto a PDFVD estão elevadas quando comparadas a seus controles. Neste mesmo estudo, a progressão para estágios de IC direita está associada à depressão da função sistólica, na manutenção de elevada PDFVD.

Em nosso estudo, observamos uma significativa correlação entre a hipertrofia ventricular direita e a resistência vascular pulmonar, reforçando o conceito de que o remodelamento ventricular hipertrófico corresponde a um mecanismo adaptativo na tentativa de regular o aumento do estresse de parede imposto pela sobrecarga de pressão. Apesar desta relação, não observamos diferenças no grau de hipertrofia ventricular direita entre os grupos MCT água e MCT suco, mesmo com a demonstração anterior da redução da resistência vascular pulmonar pelo tratamento. Isso pode ser devido à modesta melhora na responsividade vascular pulmonar frente ao tratamento com suco de uva, fazendo com que a hipertrofia seja necessária para a manutenção de uma PSVD aumentada.

Estudos que utilizaram ecocardiografia transtorácica para o monitoramento do desenvolvimento da hipertensão pulmonar e remodelamento cardíaco neste modelo demonstraram que a dilatação ventricular direita já está presente em estágios iniciais (Kato et al., 2003). E ainda, que esta deva progredir em paralelo com aumentos na espessura da parede livre do VD e regurgitação tricúspide durante os estágios terminais da doença (Jones et al., 2002).

Neste contexto, estudos têm demonstrado que variações no gradiente de pressão diastólico final do VD possam levar a alterações na interação

mecânica entre os ventrículos. Chang et al (2007), avaliando 70 pacientes com diferentes graus de HAP através de ecocardiografia, demonstraram que o índice de desempenho do miocárdio tanto do VD como do VE em pacientes com HAP severa, PSVD >60mmHg, tornou-se maior como resultado do prolongamento do tempo de relaxamento isovolumétrico. Em adição, o aumento da razão E/A, e o declínio da fração de ejeção, de ambos os ventrículos, demonstram que a função ventricular sistólica e diastólica do VE é alterada em pacientes com HAP, de forma secundária à disfunção ventricular direita. Resultados similares foram descritos no modelo de HAP induzido por MCT. Lamberts et al (2006) avaliaram corações isolados, após 28 dias de indução e, em suas análises, demonstraram que o aumento do volume do VD resulta no aumento na pressão diastólica final do VE nestes animais, mas não em seus controles, na ausência de qualquer alteração na função sistólica deste.

Tendo em vista esta relação, buscamos avaliar se as alterações na PDFVD poderiam estar associadas a alterações adicionais na função ventricular esquerda, e se o tratamento com suco de uva poderia interferir em tal relação. Sendo assim, avaliamos parâmetros importantes associados tanto à função diastólica quanto sistólica do VE através da ecocardiografia transtorácica. Em nossas análises, não observamos qualquer alteração no que diz respeito tanto à função sistólica, avaliada através do débito cardíaco, fração de ejeção, mudança de área fracional, fração de encurtamento, diastólica avaliada através da razão E/A do fluxo pela mitral ou índice de desempenho do miocárdio nos grupos avaliados, independentes da indução de HAP ou tratamento com suco de uva nestes animais.

A partir destas análises, sugerimos que este período de indução corresponda a um estágio de transição da hipertrofia compensatória para a IC direita. Embora a demonstração de que a função sistólica de ambos os ventrículos esteja preservada, o aumento na PDFVD pode estar envolvido na compensação transitória para a manutenção do DC e fluxo adequado através da circulação pulmonar (Guarracino et al. 2005).

Poucos estudos têm avaliado o papel das EROs nos estágios finais de hipertrofia ventricular direita compensatória *in vivo*. Tem-se sugerido que a função celular das EROs como segundo mensageiros possa regular a transdução de sinais mitogênicos em uma variedade de tipos celulares, como células musculares lisas, células endoteliais e fibroblastos (Kunsch & Medford, 1999). Neste contexto, Tanaka et al. (2001), analisando a função regulatória das EROs na sinalização hipertrófica em cultura de cardiomiócitos de ratos adultos, demonstraram que as EROs originadas pela NADPH oxidase em resposta à estimulação por ET-1, levam ao aumento da expressão de p-ERK e subsequente hipertrofia dos cardiomiócitos. A supressão desta resposta pelo pré-tratamento com antioxidantes, como N-acetilcisteína e catalase, reforçam a possibilidade de que as EROs também estejam envolvidas na sinalização hipertrófica em cardiomiócitos.

Apesar do exato mecanismo pelo qual as EROs estejam envolvidas na transição de estágios iniciais para os finais de hipertrofia não esteja claro, nós propomos com base em diversos estudos *in vitro* (Siwik et al, 1999; Pimentel et al., 2001) que baixos níveis de EROs possam ser essenciais na regulação da

resposta mitogênica à sobrecarga de pressão induzida pela HAP. Em contraste, nos estágios avançados de IC, a produção de EROs excede a capacidade dos sistemas antioxidantes (Farahmad et al. 2004), podendo induzir à disfunção cardíaca.

Neste estudo, testamos o H_2O_2 como um possível sinalizador, tendo em vista sua estabilidade estrutural e alta capacidade de permear as membranas. Avaliamos o imunocconteúdo de proteínas envolvidas em vias de sobrevivência e manutenção da função (ERK1/2 e Akt), assim como vias associadas à disfunção e/ou morte celular (JNK e caspase-3) enfocando o papel da Trx1 na modulação das concentrações de H_2O_2 no ventrículo direito.

Estudos *in vitro* têm consistentemente demonstrado que os efeitos benéficos da utilização de compostos polifenólicos nestes sistemas envolvem a formação intracelular de EROs (Ndiaye et al., 2003; Ndiaye et al., 2005). No entanto, estudos *in vivo* têm indicado que sua atuação na manutenção do estado redox celular seja um dos determinantes centrais na cardioproteção mediada por estes compostos (Martinez et al., 2000; Leonard et al. 2003). Desta forma, uma vez que estes compostos poderiam atuar tanto na geração quanto na remoção de EROs, tais como o H_2O_2 , buscamos verificar o papel dos compostos polifenólicos presentes no suco de uva preta na modulação redox das vias de sinalização referidas anteriormente.

Após avaliarmos as concentrações teciduais de H_2O_2 no VD, observamos que tanto no grupo MCT água quanto no grupo controle suco as concentrações de H_2O_2 são em torno de 1,5 vezes maiores do que no grupo

controle água. No entanto, no grupo MCT suco as concentrações retornam aos valores basais.

Apesar de não termos determinado as possíveis fontes de H₂O₂, estudos que avaliaram a hipertrofia ventricular esquerda e progressão à IC, utilizando-se de diferentes modelos animais e material humano, têm sugerido tanto a NADPH oxidase quanto a própria mitocôndria como as principais fontes do aumento na produção de EROs (Ide et al., 1999; Murdoch et al., 2006). Adicionalmente, mas em menor extensão, a xantina oxidase e o desacoplamento da NOS também tem sido referidos (Takimoto et al., 2005; Tsutsui et al., 2006).

Contudo, no contexto da IC direita, recentemente, Redout et al. (2007) utilizaram o modelo de HAP induzido por MCT com o intuito de determinar as principais fontes de EROs envolvidas na IC direita. Diferente do papel central da NADPH oxidase apresentado na IC esquerda (Heymes et al., 2003), na IC direita tanto componentes citosólicos quanto mitocondriais participam na geração destas espécies. Em suas análises, demonstraram o aumento no imunoconteúdo da subunidade gp91phox da NADPH oxidase e de seu ativador Rac1 associada ao aumento seletivo na expressão da subunidade B do complexo II mitocondrial. Também foi demonstrada a produção de EROs nestes dois sítios medida por quimiluminescência induzida por lucigenina, em homogeneizado de VD nos ratos insuficientes, mas não em seus controles.

No entanto, a determinação das principais fontes envolvidas na modulação redox mediada pelos compostos polifenólicos, do suco de uva ou vinho tinto, permanece por ser elucidada. Estudos que tentaram determinar no

endotélio vascular as possíveis fontes envolvidas neste processo falharam em demonstrar alguma influência da inibição farmacológica específica sobre a função mitocondrial, xantina oxidase, ou citocromo P450 sobre o vasorelaxamento mediado por estes (Ndiaye et al., 2003). Em adição, o relaxamento mediado pelo NO na presença dos polifenóis presentes no vinho tinto foi similar em aortas de ratos *knockout* para gp91^{phox} comparados aos seus controles selvagens, excluindo, desta forma, também o papel da NADPH oxidase como um possível mediador (Ndiaye et al., 2005). Apesar disso, não existem dados disponíveis sobre estas relações no miocárdio, principalmente no VD.

Assim, tem-se sugerido que os próprios compostos polifenólicos possam ser fonte de H₂O₂ através de um processo conhecido como autooxidação (Cao et al., 1997; Mochizuki et al., 2002). Recentemente, Akagawa et al (2003) demonstraram em condições fisiológicas que compostos fenólicos e polifenólicos naturais são capazes de gerar quantidades significativas de H₂O₂. Em adição, a avaliação temporal da produção de H₂O₂ pelos extratos obtidos a partir destes compostos, demonstrou aumentos crescentes na produção de H₂O₂ sem que se atingisse um platô durante um período de incubação de 48 horas. Em sistemas biológicos, recentemente Manach et al (2005), a partir da análise dos dados gerados em estudos sobre biodisponibilidade e bioeficácia dos polifenóis em humanos, concluíram que após a ingestão oral, estes compostos são amplamente distribuídos e presentes nos diferentes tecidos, incluindo o coração. Apesar disso, tal relação descrita por Akagawa et al (2003) não deve ser tão pronunciada *in vivo* pela presença de um sistema antioxidante

que deve regular a taxa de produção gerada por estes compostos através da eliminação das EROs.

Assim, o aumento nas concentrações de H_2O_2 detectado no tecido ventricular direito foi semelhante no grupo MCT água e controle suco. Apesar disso, parece pouco provável que estes grupos compartilhem de uma mesma fonte geradora. Desta forma, sugerimos que os metabólitos gerados a partir da ingestão de suco de uva preta possam atuar como pró-oxidantes nos sistemas biológicos, podendo induzir a adaptação dos sistemas antioxidantes.

Em organismos multicelulares, uma importante resposta ao aumento nos níveis de H_2O_2 é o aumento na produção de antioxidantes e reparo protéico que permitam a adaptação a condições oxidativas. No entanto, nestes organismos, o H_2O_2 ainda pode ativar vias de sinalização envolvidas na proliferação celular, diferenciação, migração, ou apoptose. Apesar dos mecanismos relacionados aos efeitos dependentes das concentrações de H_2O_2 e/ou específicos ao tipo celular em questão não serem claros, diversas evidências sugerem que os níveis, localização, e/ou atividade de antioxidantes celulares são fatores importantes na determinação da resposta biológica iniciada pelo H_2O_2 (Veal et al., 2007).

De fato, estudos têm demonstrado que as EROs podem estar envolvidas na determinação tanto das respostas hipertróficas quanto apoptóticas em cardiomiócitos. O aumento excessivo nas concentrações intracelulares de EROs, a partir de fontes endógenas ou exógenas, pode levar a o desbalanço redox, podendo gerar danos oxidativos ao DNA, lipídeos e proteínas e, assim

pode desregular as funções celulares, o que resulta na indução de apoptose das células danificadas (Parman et al., 1999).

Recentemente, Haendeler et al (2004) investigaram os efeitos de diferentes concentrações de H_2O_2 na expressão de Trx1 e seu papel na indução de apoptose em cultura de células endoteliais. Seus resultados demonstraram que baixas concentrações de H_2O_2 intracelulares, obtidas pelo tratamento destas células com H_2O_2 exógeno (10 e $50\mu\text{mol/L}$) ou através da indução da formação endógena pela exposição destas ao estresse de cisalhamento, induziram a expressão de mRNA para Trx1, e inibição da apoptose nestas células. Isto sugere que o sistema redox Trx possa desempenhar um importante papel na manutenção do estado redox e proteção contra a apoptose em células endoteliais.

Análises em corações de pacientes com IC, submetidos a transplante, têm demonstrado que estes são caracterizados morfológicamente por um significativo aumento na apoptose de cardiomiócitos (Olivetti et al., 1997). Recentemente, Brixius et al (2007) documentaram em corações explantados de pacientes com IC a regulação negativa das isoformas de Prx-3 e Prx-6. As Prx são uma família de antioxidantes dependentes de Trx, cujas principais funções estão implicadas na modulação das concentrações teciduais de H_2O_2 (Rhee et al., 2005). Assim, além de protegerem as células contra o estresse oxidativo, o sistema Trx-Prx ainda pode estar implicado na modulação da sinalização mediada pelo H_2O_2 .

Desta forma, a regulação da atividade antioxidante não é somente importante na adaptação ao ambiente, mas também na modulação dos sinais

de transdução mediados pelo H_2O_2 . Em adição, estudos recentes têm identificado diversos mecanismos nos quais as enzimas antioxidantes são necessárias como sensores na modulação dos sinais gerados pelo H_2O_2 (Buck et al., 2001; Veal et al., 2004). Com base nisto, avaliamos se a Trx1 poderia estar envolvida na modulação da sinalização mediada pelo H_2O_2 .

Como demonstramos, nos grupos MCT água e controle suco, a magnitude das variações nas concentrações de H_2O_2 em ambos os grupos está associada ao aumento no imunoconteúdo de Trx1, e refletidas em um aumento ainda maior no grupo MCT suco, que diferente dos anteriores, apresenta os menores valores de H_2O_2 . Estes dados sugerem que o H_2O_2 represente tanto um estímulo para a regulação da expressão de Trx1 no coração, quanto o principal alvo celular de suas ações. Assim, sugerimos que a regulação da atividade das Prxs (Rhee et al., 2001), mediadas pela ação oxiredutora da Trx1 sobre esse sistema, possa ser um importante mecanismo envolvido na modulação da sinalização pelo H_2O_2 no VD, através da regulação de suas concentrações.

Estudos avaliando o papel das EROs na determinação de diferentes fenótipos cardíacos, têm sugerido que a ativação diferencial concentração-dependente de vias de sinalização quinase determine se as EROs levarão à hipertrofia ou morte por apoptose dos cardiomiócitos (Xiao et al., 2001; Wei et al., 2001). Em cardiomiócitos de ratos adultos tratados *in vitro* com baixas concentrações de H_2O_2 ($\leq 50 \mu\text{mol/L}$), Know et al (2003) demonstraram um aumento na síntese protéica na ausência de apoptose, mediada pelo aumento na ativação de ERK1/2, mas não de JNK, p38 ou Akt. No entanto, em

concentrações maiores de H_2O_2 ($\geq 100\mu\text{mol/L}$) observaram um aumento das células positivas a TUNEL na ausência de variações na síntese protéica, relacionadas à co-ativação de vias pró-apoptóticas como JNK e p38, em paralelo a vias de sobrevivência como ERK1/2 e Akt, cuja ativação neste contexto, deve estar direcionada à regulação da apoptose, mais do que à determinação de hipertrofia dos cardiomiócitos (Aikawa et al., 2000).

O envolvimento destas vias de sinalização de forma diferencial na hipertrofia compensatória e nos estágios avançados de IC em humanos tem sido extensamente analisado. No entanto, existe significativa variação entre os resultados obtidos, devidos em parte, ao estágio avaliado e também ao tipo de estímulo envolvido. Cook et al. (1999), demonstraram que a atividade de JNK e p38 se mostraram aumentadas, sendo que a atividade da ERK1/2 se mostrou inalterada em pacientes com IC devido à cardiomiopatia isquêmica. Haq et al. (2001) em suas análises, observaram um aumento tanto na atividade quanto na expressão das MAPK: ERK1/2, p38 e JNK, associados ao aumento da expressão de p-Akt, no coração de pacientes com IC tanto derivada de cardiomiopatia isquêmica quanto da forma idiopática de cardiomiopatia dilatada. Com base nestes resultados, sugere-se que a IC seja caracterizada pela ativação de um perfil hipertrófico, sendo ativadas paralelamente vias tanto pró quanto anti-apoptóticas, sendo esta co-ativação determinante da capacidade funcional.

Assim, o entendimento do estado de ativação destas proteínas quinase no VD durante estágios de transição, se torna importante para entendermos o papel do H_2O_2 na modulação e direcionamento da transdução de sinais durante

a transição da hipertrofia compensatória à IC direita. Observamos que as oscilações nas concentrações de H₂O₂ e Trx1 se mostraram associadas à modulação diferencial da sinalização pela ERK1/2 na HAP marcada pelo aumento de sua ativação no grupo MCT água, mas redução no grupo MCT suco. No entanto, em ambos os grupos MCT observou-se um significativo aumento no imunoconteúdo de caspase-3, quando comparados a seus respectivos controles. Associação semelhante à descrita para o grupo MCT água foi observada no grupo controle suco, no entanto neste último, o aumento da ativação de ERK1/2 não está associado a qualquer alteração no imunoconteúdo de caspase-3. Um importante aspecto a ser ressaltado, é que as variações nas concentrações de H₂O₂ e Trx1 não parecem exercer qualquer efeito sob a ativação da JNK e Akt nos diferentes grupos experimentais no período analisado.

A relação entre a sinalização mediada pelas MAPK, em especial, pela ativação de p38 pôde ser observada diferencialmente nos estágios iniciais de hipertrofia compensatória e de IC direita. Buermans et al (2005) demonstraram o significativo aumento na ativação de p38 nos animais que desenvolveram IC direita quando comparados aos grupos com hipertrofia compensatória ou controle. Segundo os autores, a ativação diferencial de p38 nesses grupos pode ser um dos fatores associados à presença de apoptose nestes ventrículos. Posteriormente, Redout et al (2007) não só confirmaram os resultados apresentados anteriormente, mas ainda demonstraram que o aumento na ativação de p38 nestes ventrículos estava associado ao aumento do estresse oxidativo, confirmado através da extensa presença de nitração protéica no tecido ventricular direito.

Em nosso estudo, demonstramos que a ativação do processo apoptótico, caracterizado pelo aumento na expressão de caspase-3, precede a indução da sinalização pró-apoptótica mediada pelas MAPK em resposta ao estresse oxidativo. Semelhante perfil foi observado por Lou et al (2005) investigando o papel das MAPK (ERK1/2, p38 e JNK) nos estágios iniciais de cardiomiopatia e IC induzidas por adriamicina e o seu papel na sinalização apoptótica. Em suas análises, a ativação de caspase-3, assim como a redução na razão Bcl2/Bax, ocorreu ainda nos estágios iniciais de cardiomiopatia. A ativação de p38 e JNK, no entanto, ocorreram apenas quando a IC estava estabelecida, sendo que a caspase-3 se mantinha ativada ainda neste estágio.

A ativação da sinalização apoptótica observada no presente estudo, deve ser induzida pela própria progressão da HAP, como observado pela correlação entre a resistência vascular pulmonar e caspase-3. Foram demonstradas também modificações na expressão gênica destes fatores por Ecartot-Laubriet et al (2002) em diferentes estágios da progressão da HAP induzida por MCT. Em suas análises, o período de 21 dias após a indução de HAP com dose única i.p. de MCT (60mg/kg), foi marcado pela execução do programa apoptótico no VD, confirmado pelo aumento em 150% na atividade de caspase-3 e detecção de células positivas a TUNEL na região epicárdica e endocárdica do VD. Ainda, a progressão da apoptose coincidiu com a redução dos níveis de mRNA para Bcl2 e uma redução mais limitada na transcrição de Bax, resultando na inversão da relação Bcl2/Bax entre o período de 14 e 21 dias (1,2 e 0,7, respectivamente). Isto sugere que a expressão de Bcl2 possa desempenhar um importante papel na prevenção da execução da apoptose

durante os estágios iniciais de hipertrofia até a transição à IC direita, sendo o declínio da função contrátil um evento posterior.

Em humanos, a ativação da via de sinalização associada à calcineurina-NFAT parece ser dominante nos estágios de hipertrofia compensada, apresentando tanto um aumento na sua expressão quanto na sua atividade. Em contraste, não foi detectado significativo aumento na ativação de qualquer uma das MAPK ou mesmo de Akt, sugerindo que estas não estejam envolvidas na modulação desta fase da doença (Haq et al., 2001). Assim, a ativação de ERK1/2 não parece ser determinante para este estágio da hipertrofia cardíaca compensada.

Em contrapartida, o aumento na atividade de ERK1/2 parece estar associado aos estágios de transição da hipertrofia compensatória à IC congestiva. Esta relação foi observada no miocárdio hipertrófico de ratos tanto em resposta à sobrecarga de volume (Lazou et al., 1998) como a sobrecarga de pressão, induzida por coarctação aórtica (Takeishi et al., 2001). Assim, em um ambiente deletério, com aumento na caspase-3, induzido pela administração de MCT, a ativação de ERK1/2 possivelmente em função do aumento dos níveis de H_2O_2 , possa estar associada à manutenção da compensação cardíaca direita. Os dados funcionais apontam para um quadro de transição, sendo assim, outros fatores podem estar envolvidos na ativação de vias associadas à progressão da doença.

Em muitos tipos celulares, a sinalização mitogênica através da ERK1/2 induz a entrada no ciclo celular através da indução do aumento da expressão de ciclina D1 e redução da quinase inibidora dependente de ciclinas p27^{Kip1}

(Scarabelli et al., 2002). Nesta mesma janela temporal, foi descrito, no modelo de HAP induzida por MCT, o aumento na expressão gênica de ciclina D1 e redução da p27^{Kip1}, acompanhadas pelo aumento sustentado da expressão gênica de ciclina A e E (Ecarnot-Laubriet et al., 2002).

A relevância da co-ativação de processos apoptóticos e mitogênicos permanece por ser elucidada. No entanto, no que diz respeito ao crescimento hipertrófico ou hiperplásico em resposta à sobrecarga de pressão, as condições hemodinâmicas subjacentes parecem desempenhar um papel central na determinação desta. Se a disfunção ventricular não está presente e o ventrículo está hemodinamicamente compensado, a hipertrofia dos cardiomiócitos é a forma predominante do crescimento celular, e a proliferação dos cardiomiócitos não é significativamente maior do que em condições basais. No entanto, a multiplicação do número de cardiomiócitos parece ser a principal adaptação na promoção do crescimento cardíaco durante os estágios finais de IC (Nadal-Ginard et al., 2003).

Dado o retardo entre o aumento da expressão gênica e o aumento da expressão protéica destas proteínas envolvidas no ciclo celular descritas por Ecarnot-Laubriet et al., 2002, a ativação precoce da via da ERK1/2 durante os estágios finais de compensação pode prover a transição do crescimento hipertrófico para o hiperplásico na IC direita. No entanto, ainda permanece por ser esclarecido se a ativação da ERK1/2 possa ser benéfica ou deva pronunciar adicionalmente o fenótipo de IC. Assim, estudos têm proposto que a inibição da ERK1/2 *in vivo* pode levar à regressão da hipertrofia cardíaca e possivelmente promova a apoptose de cardiomiócitos, o que poderia ser

potencialmente benéfico para pacientes com cardiomiopatia hipertrófica com a função sistólica preservada (Muslin, 2008).

A intervenção com suco de uva preta nos animais tratados com MCT foi acompanhada da inibição da ativação de ERK1/2 pelo H_2O_2 , concomitantemente à redução de caspase-3. Isto poderia ser um fator limitante à progressão da IC direita oferecido pelo pré-tratamento com suco de uva. Assim sendo, os dados deste estudo apontam para uma ação protetora dos compostos presentes no suco diretamente no miocárdio, além dos efeitos já bem descritos na musculatura lisa vascular. Uma vez que a administração de suco a animais hígidos também foi acompanhada do aumento nas concentrações de H_2O_2 , a ação cardioprotetora observada parece ser resultante de um processo de adaptação a este estímulo pró-oxidante.

Em contraste ao referido sobre a ativação de ERK1/2 em resposta à sobrecarga de pressão, a ativação desta mesma via de sinalização está envolvida nos mecanismos de cardioproteção implicados no pré-condicionamento isquêmico. No miocárdio de suínos, a inibição farmacológica da via da ERK1/2 durante o protocolo de isquemia-reperfusão aboliu os efeitos benéficos deste processo sobre a redução da área de infarto (Strohm et al., 2000). Outros estudos também confirmaram o papel central da regulação da ERK1/2 tanto nas respostas precoces (Fryer et al., 2001) quanto tardias (Fryer et al., 1995; Ping et al., 1999) resultantes do pré-condicionamento clássico. Em adição, a ativação de ERK1/2 foi relacionada à cardioproteção mediada pelo resveratrol em ratos (Maulik et al., 1999) que pode ainda estar associada à

redução do processo apoptótico após períodos de isquemia (Dudley et al., 2008).

Entre os fatores intracelulares implicados no processo de adaptação, o envolvimento das EROs tem sido consistentemente demonstrado (Otani, 2004). O pré-condicionamento é obtido através de pequenos aumentos nas concentrações teciduais de EROs seguidos da ativação da sinalização mediada pelas MAPK (Maulik et al., 1998). A exposição de neuroblastomas a baixas concentrações (1pmol/L a 10 μ mol/L) de resveratrol induziu a fosforilação de ERK1/2. Entretanto, em concentrações maiores (50-100 μ mol/L) o resveratrol foi capaz de inibir a fosforilação desta MAPK (Miloso et al., 1999). No nosso estudo, a administração de suco de uva promoveu aumento nas concentrações teciduais de H₂O₂ associado à ativação de ERK1/2. Dada a possibilidade de que os constituintes bioativos do suco de uva sejam capazes de modular a ativação de vias de sinalização de maneira redox, parece razoável, que esta modulação seja dependente das quantidades ofertadas, a partir das quais, estes constituintes devam resultar na sinalização redox ou em danos associados ao estresse oxidativo.

Em contrapartida, foi demonstrado recentemente por El-Mowafy et al (2008), em células musculares lisas coronarianas, que componentes obtidos através de extratos de uva preta exercem efeitos antiproliferativos. Seus resultados, utilizando como proposta terapêutica o resveratrol, mostraram que este constituinte foi capaz de inibir a ativação de ERK1/2 e consequente proliferação celular induzida pelo H₂O₂, em parte, por sua capacidade antioxidante, o que não exclui a possibilidade de que este composto possa

estar modulando outras vias de sinalização relacionadas. Em nossas análises, a inibição da ativação de ERK1/2 mediada pelo H_2O_2 parece ser derivada da indução do aumento no imunoconteúdo de Trx1, mais do que propriamente de uma ação antioxidante direta destes compostos. Nossos resultados em relação à expressão de Trx1 no VD, são consistentes com os achados de Duddley et al. (2008) em resposta ao pré-tratamento com baixas doses de resveratrol (2,5 ou 5,0mg/kg/dia) após protocolo de isquemia-reperfusão.

No que diz respeito ao remodelamento ventricular em resposta à sobrecarga de pressão, o tratamento de ratos submetidos à coarctação aórtica com 2,5mg/kg/dia de resveratrol foi capaz de prevenir completamente o desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda, determinada através da normalização da razão entre o peso do VE sobre o peso corporal. Em adição, neste mesmo estudo, o tratamento com resveratrol também preveniu o remodelamento concêntrico através da normalização das dimensões do septo intraventricular e da parede ventricular esquerda, tanto na sístole quanto na diástole (Juric et al., 2007).

Os efeitos benéficos do resveratrol em prevenir a hipertrofia cardíaca em resposta à sobrecarga de pressão são consistentes com outro estudo, que demonstrou efeitos benéficos com a utilização de um análogo do resveratrol, em mesmo modelo de coarctação aórtica (Li et al., 2005). Neste último, os efeitos benéficos do pré-tratamento com este análogo sobre o remodelamento ventricular esquerdo, estavam associados à redução nos níveis de H_2O_2 e inibição da fosforilação mediada pela angiotensina II sobre a PKC, ERK1/2, JNK, e p38.

Em nosso estudo, a redução da resistência vascular pulmonar pela administração de suco de uva nos animais com HAP induzida por MCT não refletiu em melhora significativa do índice de hipertrofia ventricular direita. Acreditamos que estes resultados possam ser reflexos da manutenção da população de cardiomiócitos no VD, através da redução da expressão de caspase-3. A discrepância destes resultados em relação à literatura citada pode dever-se às diferenças nos protocolos experimentais, no que diz respeito ao período observado, forma de administração, por se tratar de um alimento e não um composto isolado, ou até mesmo pelas vias de sinalização ativadas e por nossos resultados se tratarem de um efeito específico sobre o VD.

Em síntese, os principais aspectos deste estudo foram a demonstração, no modelo de HAP induzida por MCT, de que a ativação do processo de apoptose pela via das caspases antecede a sinalização pró-apoptótica induzida pelas MAPK. Demonstrando ainda, a participação do H₂O₂ como um sensor e sinalizador da ativação mitogênica no processo de remodelamento ventricular direito em resposta à sobrecarga de pressão e o papel da Trx1 na modulação e direcionamento da sinalização mediada pelo H₂O₂.

Ainda, nossos resultados indicam que os componentes bioativos do suco de uva preta, através de sua ação pró-oxidante, foram capazes de promover adaptação cardíaca, que se refletiu na melhora do quadro de *Cor pulmonale*. Este processo se mostrou dependente da modulação redox sensível de vias de sinalização associadas a proteínas quinase, mediadas pela indução da formação de H₂O₂ no tecido ventricular direito.

Os mecanismos mais importantes para a cardioproteção envolvem a adaptação ao estresse oxidativo, já demonstrados em protocolos de treinamento físico, pré-condicionamento isquêmico, entre outros (Maulik & Das, 2006). Diferente da administração de antioxidantes em doses farmacológicas, o consumo de suco de uva em regime regular, muito próximo ao hábito alimentar humano, se mostrou capaz de promover adaptação de forma semelhante aos protocolos referidos. Assim, a demonstração de que compostos dietéticos são capazes de modular a ativação de vias de sinalização e, desta forma, evitar a progressão de doenças cardiovasculares, traz uma nova perspectiva terapêutica. A este tema, se dedica a análise nutrigenômica, que pode ser uma perspectiva para a continuidade deste estudo.

7. CONCLUSÃO

A partir de nossas análises, podemos concluir que o H_2O_2 atua como uma molécula sinalizadora, estando envolvida na adaptação cardíaca mediada pelo tratamento com suco de uva, assim como na indução da ativação de ERK1/2 em modelo experimental de HAP induzida por MCT. Adicionalmente, a administração de suco de uva de forma regular e preventiva à indução de HAP, promoveu a inibição desta via de sinalização que esta relacionada ao aumento adicional do imunoconteúdo de Trx1 no VD.

8. REFERÊNCIAS

Abd El Mohsen MM, Kuhnle G, Rechner AR, Schroeter H, Rose S, Jenner P, Rice-Evans, C. A. Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radic Biol Med* 2002; 33:1693– 1702.

Aikawa R, Nawano M, Gu Y, Katagiri H, Asano T, Zhu W, et al. Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt. *Circulation* 2000; 102(23):2873–2879.

Akagawa M, Shigemitsu T, Suyama K. Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003; 67(12):2632-40.

Anselm E, Chataigneau M, Ndiaye M, Chataigneau T, Schini-Kerth VB. Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS *Cardiovascular Research* 73 (2007) 404–413

Baum GL, Crapo JD, Celli BR, Karlinsky JB: *Textbook of Pulmonary Disease*, 6th ed. Lippincott Raven, Philadelphia, PA, 1998.

Berger M, Haimowitz A, Van Tosh A, Berdoff RL, Goldberg E. Quantitative assessment of pulmonary hypertension in patients with tricuspid regurgitation using continuous wave Doppler ultrasound. *J Am Coll Cardiol* 1985; 6:359–65.

Bishopric NH, Andreaka P, Slepak T, Webster KA. Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte. *Current Opinion in Pharmacology* 2001; 1:141–150.

Boatright KM & Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation *Current Opinion in Cell Biology* 2003; 15:725–731.

Bossone E, Duong-Wagner TH, Paciocco G, Oral H, Ricciardi M, Bach DS, Rubenfire M, Armstrong WF. Echocardiographic features of primary pulmonary hypertension. *J Am Soc Echocardiogr.* 1999; 12(8):655-62.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.

Brixius K, Schwinger RHG, Hoyer F, Napp A, Renner R, Bölck B, Kümin A, Fischer U, Mehlhorn U, Werner S, Bloch W. Isoform-specific downregulation of peroxiredoxin in human failing myocardium. *Life Sciences* 2007; 81:823–831.

Buck V, Quinn J, Soto Pino T, Martin H, Saldanha J, Makino K, Morgan BA, Millar JB. Peroxide sensors for the fission yeast stress-activated mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Biol. Cell* 2001; 12:407–419.

Buermans HPJ, Redout EM, Schiel AE, Musters RJP, Zuidwijk M, Eijk PP, et al. Microarray analysis reveals pivotal divergent mRNA expression profiles early in the development of either compensated ventricular hypertrophy or heart failure. *Physiol Genomics* 2005; 21:314–23.

Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 1997; 22(5):749-60.

Chang SM, Lin CC, Hsiao SH, Lee CY, Yang SH, Lin SK, Huang WC. Pulmonary hypertension and left heart function: insights from tissue Doppler

imaging and myocardial performance index. *Echocardiography* 2007; 24(4):366-73.

Chin KM, Rubin LJ. Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51:1527–38.

Christou H, Morita T, Hsieh C, Koike H, Arkonac B, Perrella M, et al. Prevention of hypoxia-induced pulmonary hypertension by enhancement of endogenous heme oxygenase-1 in the rat. *Circ Res* 2000; 86:1224–9.

Cook SA, Sugden PH, and Clerk A. Activation of c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases in human heart failure secondary to ischaemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31:1429–1434.

Currie PJ, Seward JB, Chan KL, et al. Continuous wave Doppler determination of right ventricular pressure: a simultaneous Doppler catheterization study in 127 patients. *J Am Coll Cardiol* 1985; 6:750–6.

Cury AF, Bonilha A, Saraiva R, et al. Myocardial performance index in female rats with myocardial infarction: relationship with ventricular function parameters by Doppler echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2005; 18:454-60.

Das DK & Maulik N. Conversion of Death Signal into Survival Signal by Redox Signaling. *Biochemistry (Moscow)* 2004;69:10-17.

Das DK, Maulik N. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol Interv* 2006; 6:36–47.

Das S, Cordis GA, Maulik N, Das DK. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of CREB-dependent Bcl-2 signaling via adenosine A3 receptor activation. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol* 2005; 288:H328–H335.

Das S, Tosaki A, Bagchi D, Maulik N, Das DK. Potentiation of a survival signal in the ischemic heart by resveratrol through p38 mitogen activated protein kinase/mitogen- and stress-activated protein kinase 1/cAMP response element-binding protein signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 317:980–988.

Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J. Hypertens* 2000; 18:655–673.

Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 2002; 82:47-95.

Dudley J, Das S, Mukherjee S, Das DK. Resveratrol, a unique phytoalexin present in red wine, delivers either survival signal or death signal to the ischemic myocardium depending on dose. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2008; *in press*.

Eastwood MA. Interaction of dietary antioxidants in vivo: how fruit and vegetables prevent disease? *Q J Med* 1999;92:527–30.

Ecarnot-Laubriet A, Assem M, Poirson-Bichat F, Moisant M, Bernard C, Lecour S, Solary E, Rochette L, Teyssier JR. Stage-dependent activation of cell cycle and apoptosis mechanisms in the right ventricle by pressure overload. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1586:233-242.

El-Mowafy AM & White RE. Resveratrol inhibits MAPK activity and nuclear translocation in coronary artery smooth muscle: reversal of endothelin-1 stimulatory effects. *FEBS Lett* 1999 ;451(1):63-7.

El-Mowafy AM, Alkhalaf M, El-Kashef HA. Resveratrol Reverses Hydrogen Peroxide-induced Proliferative Effects in Human Coronary Smooth Muscle Cells: A Novel Signaling Mechanism *Archives of Medical Research* 2008; 39:155-161.

Farahmand F, Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale *Molecular and Cellular Biochemistry* 2004; 260:21–29.

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

Foo RS-Y, Mani K, Kitsis RN. Death begets failure in the heart. *J Clin Invest* 2005; 115:565-571.

Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993; 341:454-7.

Frasch HF, Marshall C, Marshall BE. Endothelin-1 is elevated in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1999; 276:304-310.

Fryer RM, Hsu AK, Gross GJ. ERK and p38 MAP kinase activation are components of opioid-induced delayed cardioprotection. *Basic Res Cardiol* 1995; 96:136–142.

Fryer RM, Pratt PF, Hsu AK, Gross GJ. Differential activation of extracellular signal regulated kinase isoforms in preconditioning and opioid-induced cardioprotection. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296:642–649.

Gaine SP, Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 1998; 352:719–25.

Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, et al. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2005; 353:2148 –57.

Gerdes AM & Capasso JM. Structural remodeling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27:849–856.

Gillespie MN, Olson JW, Reinsel CN, O'Connor WN, Altieri RJ. Vascular hyperresponsiveness in perfused lungs isolated from monocrotaline-treated rats. *Am. J. Physiol.*, in press, 1986.

Goldim, J. R. Pesquisa em saúde: leis, normas e diretrizes. 3^a ed. Porto Alegre: HCPA, 1997.

González A, Lopez B, Ravassa S, Querejeta R, Larman M, Díez J, Fortuño MA. Stimulation of Cardiac Apoptosis in Essential Hypertension: potentiation role of angiotensin II. *Hypertension* 2002; 39:75-80.

Greyson C, Xu Y, Lu L, Schwartz GG. Right ventricular pressure and dilatation during pressure overload determine dysfunction after pressure overload, *Am. J. Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278:H1414-H1420.

Guarracino F, Cariello C, Danella A, Doroni L, Lapolla F, Vullo C, Pasquini C, Stefani M. Right ventricular failure: physiology and assessment. *Minerva Anesthesiol* 2005; 71(6):307-12.

Haddad F, Hunt SA, Rosenthal DN, Murphy DJ. Anatomy, Physiology, Aging, and Functional Assessment of the Right Ventricle. *Circulation*. 2008;117:1436-1448.

Haendeler J, Tischler V, Hoffmann J, Zeiher AM, Dimmeler S. Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression. *FEBS Letters* 2004; 577:427–433.

Haider N, Narula N, Narula J. Apoptosis in Heart Failure Represents Programmed Cell Survival, Not Death, of Cardiomyocytes and Likelihood of Reverse Remodeling. *Journal of Cardiac Failure* 2002; 6:S512-S517.

Halliwell B, Zhao K, Whiteman M. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? *Free Radic Res* 2000; 33:819– 830.

Haq S, Choukroun G, Lim H, Tymitz KM, del Monte F, Gwathmey J, Grazette L, Michael A, Hajjar R, Force T, and Molkenstein JD. Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation* 2001; 103:670–677.

Hessel MHM, Steendijk P, den Adel B, Schutte CI, van der Laarse A. Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H2424–H2430, 2006.

Hetts SW. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998; 279:300–7.

Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel JL, Hasenfuss G, Shah AM. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41(12):2164-71.

Hilfiker-Kleiner D, Landmesser U, Drexler H. Molecular Mechanisms in Heart Failure. *JACC* 2006; 48:A56–A66.

Hinderliter AL, Willis PW 4th, Long W, et al. Frequency and prognostic significance of pericardial effusion in primary pulmonary hypertension. PPH Study Group. Primary pulmonary hypertension. *Am J Cardiol* 1999; 84:481– 4.

Humbert M, Morrell N, Archer S, Stenmark K, MacLean M, Lang I, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(12 Suppl S):13S–24S.

Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, et al. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:1023–30.

Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K, Arimura K, Egashira K, Takeshita A. Mitochondrial electron transport complex I is a

potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res.* 1999; 85(4):357-63.

Imamura G, Bertelli AA, Bertelli A, Otani H, Maulik N, Das DK. Pharmacological preconditioning with resveratrol: an insight with iNOS knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282(6):H1996-2003.

Jeffery T, Morrell N. Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 2002; 45:173–202.

Juric D, Wojciechowski P, Das DK, Netticadan T. Prevention of concentric hypertrophy and diastolic impairment in aortic-banded rats treated with resveratrol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292:2138-2143.

Kaga S, Zhan L, Matsumoto M, Maulik N. Resveratrol enhances neovascularization in the infarcted rat myocardium through the induction of thioredoxin 1, heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor. *Mol Cell Cardiol* 2005; 39(5):813-22.

Kang PM & Izumo S. Apoptosis in heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases. *TRENDS in Molecular Medicine* 2003; 9:177-182.

Kanoh M, Takemura G, Miaao J, Hayakawa Y, Aoyama T, Nishigaki K, Noda T, Fujiwara T, Fukuda K, Mitatoguchi S, Fujiwara H: Significance of myocytes with DNA in situ nick-end labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation* 1999; 99:2757–2764.

Kato Y, Iwase M, Kanazawa H, Kawata N, Yoshimori Y, Hashimoto K, Yokoi T, Noda A, Takagi K, Koike Y, Nishizawa T, Nishimura M, Yokota M. Progressive

development of pulmonary hypertension leading to right ventricular hypertrophy assessed by echocardiography in rats. *Exp Anim* 2003; 52(4):285-94.

Klein D, Kern RM, Sokol RZ. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Biochem Mol Biol* 1995; 36:1.

Kunapuli S, Rosanio S, Schwarz ER. "How Do Cardiomyocytes Die?" Apoptosis and Autophagic Cell Death in Cardiac Myocytes. *Journal of Cardiac Failure* 2006; 12:381-391.

Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res.* 1999; 85(8):753-66.

Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2003; 35: 615–621.

Lamberts RR, Vaessen RJ, Westerhof N, Stienen GJ. Right ventricular hypertrophy causes impairment of left ventricular diastolic function in the rat. *Basic Res Cardiol* 2007;102(1):19-27.

Lazou A, Sugden PH, Clerk A. Activation of mitogen-activated protein kinases (p38-MAPKs, SAPKs/JNKs and ERKs) by the G-protein-coupled receptor agonist phenylephrine in the perfused rat heart. *Biochem J* 1998; 332:459–465.

Leonard S, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, Shi X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309:1017–1026.

Li HL, Wang AB, Huang Y, Liu DP, Wei C, Williams GM, Zhang CN, Liu G, Liu YQ, Hao DL, Hui RT, Lin M, Liang CC. Isorhapontigenin, a new resveratrol analogue, attenuates cardiac hypertrophy via blocking signaling transduction pathways. *Free Radic Biol Med* 2005; 38:243–257.

Li JM, Gall NP, Grieve DJ, et al. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension* 2002; 40:477–84.

Litwin SE, Katz SE, Morgan JP, et al. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation* 1994; 89:345-54.

Lou H, Danelisen I, Singal PK. Involvement of mitogen-activated protein kinases in adriamycin-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H1925–H1930.

Mahmud M & Champion HC. Right ventricular failure complicating heart failure: pathophysiology, significance, and management strategies. *Curr Cardiol Rep* 2007; 9:200–208.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 2005; 81(1 Suppl):230S-242S.

Martinez J & Moreno JJ. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem Pharmacol* 2000; 59:865–870.

Maruyama H, Watanabe S, Kimura T, Liang J, Nagasawa T, Onodera M, Aonuma K, Yamaguchi I. Granulocyte colony-stimulating factor prevents progression of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Circ J*. 2007; 71(1):138-43.

Mason N, Springall DB, Burke M, Pollock J, Mikhail G, Yacoub M, et al. High expression of endothelial nitric oxide synthase in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *J Pathol* 1998; 185:313–8.

Mathew GR, Gloster ES, Sundararajan T, Thompson CI, Zeballos GA, H Michael. monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J Appl Physiol* 1997; 82:1493-1498.

Maulik N, Yoshida T, Zu YL, Banerjee A, Das DK. Ischemic stress adaptation of heart triggers a tyrosine kinase regulated signaling pathway: A potential role for MAPK AP Kinase 2. *Am. J. Physiol.*1998; 275:1857–1864.

Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 39:44–84.

McLaughlin VV, Shillington A, Rich S. Survival in primary pulmonary hypertension: the impact of epoprostenol therapy. *Circulation* 2002; 106:1477–82.

Mercier JC, DiSessa TG, Jarmakani JM, et al. Two-dimensional echocardiographic assessment of left ventricular volumes and ejection fraction in children. *Circulation* 1982; 65:962-69.

Miloso M, Bertelli AAE, Nicolini G, Tredici G. Resveratrol-induced activation of the mitogen-activated protein kinases ERK1 and ERK2, in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 1999; 264:141–144.

Mittal CK & Murad F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:4360–4364.

Mochizuki M, Yamazaki S, Kano K, Ikeda T. Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1569(1-3):35-44.

Monnet E, Chachques JC. Animal Models of Heart Failure: What Is New? *Ann Thorac Surg* 2005;79:1445–53.

Murdoch CE, Zhang M, Cave AC, Shah AM. NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovasc Res* 2006; 71(2):208-15.

Muslin AJ. MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clin Sci (Lond)* 2008; 115(7):203-18.

Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res.* 2003; 92(2):139-50.

Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M. Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 2000; 102:865–70.

Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, et al. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Eng J Méd* 1996; 335:1182–9.

Ndiaye M, Chataigneau T, Andriantsitohaina R, Stoclet JC, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:371–7.

Ndiaye M, Chataigneau T, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols induce EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries through the redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway. *Br J Pharmacol* 2004;142:1131–6.

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

Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Eng J Med* 1997; 336:1131–41.

Parman T, Wiley MJ, Wells PG. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat Med* 1999; 5(5):582-5.

Pichardo J, Palace V, Farahmand F, Singal PK. Myocardial oxidative stress changes during compensated right heart failure in rats. *Mol Cell Biochem.* 1999; 196(1-2):51-7.

Pimentel DR, Amin JK, Xiao L, Miller T, Viereck J, Oliver-Krasinski J, et al. Reactive oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes. *Circ Res* 2001; 89:453–60.

Ping P, Zhang J, Cao X, Kong D, Tang XL, Qiu Y, Manchikalapudi S, Auchampach JA, Black RG, Bolli R. PKC-dependent activation of p44/p42 MAPKs during myocardial ischemia-reperfusion in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999; 276:H1468–H1481.

Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 2008; 118:2372–2379.

Raymond RJ, Hinderliter AL, Willis PW, et al. Echocardiographic predictors of adverse outcomes in primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1214 –9.

Redout EM, Wagner MJ, Zuidwijk MJ, Boer C, Musters RJP, van Hardeveld C, Paulus WJ, Simonides WS. Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. *Cardiovascular Research* 2007; 75:770–781.

Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radicals in Biology and Medicine* 2005; 38:1543–1552.

Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* 2001; 52:35–41.

Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, et al. Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann Intern Med* 1987; 107:216 –23.

Rudarakanchana N, Trembath RC, Morrell NW. New insights into the pathogenesis and treatment of primary pulmonary hypertension. *Thorax*. 2001;56(11):888-90.

Runo JR & Loyd JE. Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 2003; 361:1533–44.

Sabbah HN, Sharov VG: Apoptosis in heart failure. *Prog Cardiovasc Dis* 1998; 40:549-562.

Santamore WP, Dell'Italia LJ. Ventricular interdependence: significant left ventricular contributions to right ventricular systolic function. *Prog Cardiovasc Dis*. 1998; 40: 289–308.

Scarabelli TM, Stephanou A, Pasini E, Comini L, Raddino R, Knight RA, Latchman DS. Different signaling pathways induce apoptosis in endothelial cells and cardiac myocytes during ischemia/reperfusion injury. *Circ Res*. 2002; 90(6):745-8.

Schafer FQ & Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001; 30:1191–1212.

Schwerk C, Schulze-Osthoff K. Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochemical Pharmacology* 2003; 66:1453–1458.

Seddon M, Looi YH, Shah AM. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart* 2007; 93:903-907.

Simonneau G, Galie N, Rubin LJ, et al. Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:5S–12S.

Sitbon O, Humbert M, Nunes H, et al. Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: prognostic factors and survival. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40:780–8.

Siwik DA, Tzortzis JD, Pimental DR, Chang DL, Pagano PJ, Singh K, et al. Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype, and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Circ Res* 1999; 85:147–53.

St Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Ischaemic heart-disease and wine.. *Lancet* 1979; 1(8129):1294.

Stenmark K, Gerasimovskaya E, Nemenoff R, Das M. Hypoxic activation of adventitial fibroblasts: role in vascular remodeling. *Chest* 2002; 122(6 Suppl):326S–34S.

Stennicke HR, Deveraux QL, Humke EW, Reed JC, Dixit VM, Salvesen GS: Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* 1999; 274:8359-8362.

Strohm C, Barancik M, v. Bruehl ML, Kilian SAR, Schaper W. Inhibition of the ER-Kinase by PD98059 and UO126 counteracts ischemic preconditioning in pig myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36:218–229.

Sugden PH and Clerk A. Oxidative stress and growth-regulating intracellular signaling pathways in cardiac myocytes. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8:2111–2124.

Takeishi Y, Huang Q, Abe J, Glassman M, Che W, Lee JD, Kawakatsu H, Lawrence EG, Hoit BD, Berk BC, Walsh RA. Src and multiple MAP kinase activation in cardiac hypertrophy and congestive heart failure under chronic pressure-overload: Comparison with acute mechanical stretch. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:1637–1648.

Takimoto E, Champion HC, Li M, Ren S, Rodriguez ER, Tavazzi B, Lazzarino G, Paolocci N, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA. Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load. *J Clin Invest.* 2005; 115(5):1221-31.

Takimoto E & Kass DA. Role of Oxidative Stress in Cardiac Hypertrophy and Remodeling. *Hypertension* 2007; 49; 241-248.

Tanaka K, Honda M, Takabatake T. Redox regulation of MAPK pathways and cardiac hypertrophy in adult rat cardiac myocyte. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37(2):676-85.

Thenappan T, Shah SJ, Rich S, Gomberg-Maitland M. A USA-based registry for pulmonary arterial hypertension: 1982–2006. *Eur Respir J* 2007; 30:1103–10.

Tsutsui H, Ide T, Kinugawa S. Mitochondrial oxidative stress, DNA damage, and heart failure. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8(9-10):1737-44.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 39:44–84.

Veal EA, Day AM, Morgan BA. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell* 2007; 26(1):1-14.

Veal EA, Findlay VJ, Day AM, Bozonet SM, Evans JM, Quinn J, Morgan BA. A 2-Cys peroxiredoxin regulates peroxide-induced oxidation and activation of a stress-activated MAP kinase. *Mol. Cell* 2004; 15:129–139.

Voelkel NF, Quaife RA, Leinwand LA, Barst RJ, McGoon MD, Meldrum DR, Dupuis J, Long CS, Rubin LJ, Smart FW, Suzuki YJ, Gladwin M, Denholm EM, Gail DB; National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group on Cellular and Molecular Mechanisms of Right Heart Failure. Right ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. *Circulation* 2006; 114(17):1883-91.

Wei S, Rothstein EC, Fliegel L, Dell'Italia LJ, Lucchesi PA. Differential MAP kinase activation and Na(+)/H(+) exchanger phosphorylation by H₂O₂ in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281:C1542–50.

Werchan PM, Summer WR, Gerdes AM, McDonough KH. Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 1989; 256:H1328–36.

White AA, Crawford KM, Patt CS, Lad PJ. Activation of soluble guanylate cyclase from rat lung by incubation or by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1976; 251:7304–7312, 1976.

Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: Antioxidants Or Signalling Molecules? *Free Radical Biology & Medicine* 2004; 36:838 – 849.

Xiao L, Pimental DR, Amin JK, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. MEK1/2-ERK1/2 mediates alpha1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:779–87.

Zhu P, Huang L, Ge X, Yan F, Wu R, Ao Q. Transdifferentiation of pulmonary arteriolar endothelial cells into smooth muscle-like cells regulated by myocardin involved in hypoxia-induced pulmonary vascular remodelling. *Int J Exp Pathol* 2006; 87:463–74.

Zuckerbraun B, Chin B, Wegiel B, Billiar T, Czimadia E, Rao J, et al. Carbon monoxide reverses established pulmonary hypertension. *J Exp Med* 2006; 203:2109–19.