

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

ISADORA SCHEIN SALVADOR

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO DE MIRTILO SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO NO VENTRÍCULO DIREITO DE RATOS SUBMETIDOS À
HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR POR MONOCROTALINA**

Porto Alegre
2019

ISADORA SCHEIN SALVADOR

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO DE MIRTILO SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO NO VENTRÍCULO DIREITO DE RATOS SUBMETIDOS À
HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR POR MONOCROTALINA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado a Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo

Co-orientador: Dr. Patrick Türck

Porto Alegre
2019

CIP - Catalogação na Publicação

Salvador, Isadora Schein

Avaliação dos efeitos do extrato de mirtilo sobre o estresse oxidativo no ventrículo direito de ratos submetidos à hipertensão arterial pulmonar por monocrotalina / Isadora Schein Salvador. -- 2019.

46 f.

Orientador: Alex Sander da Rosa Araujo.

Coorientador: Patrick Turck.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Curso de Nutrição, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Extrato de mirtilo. 2. Estresse oxidativo. 3. Hipertensão arterial pulmonar. I. da Rosa Araujo, Alex Sander, orient. II. Turck, Patrick, coorient. III. Título.

ISADORA SCHEIN SALVADOR

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO DE MIRTILO SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO NO VENTRÍCULO DIREITO DE RATOS SUBMETIDOS À
HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR POR MONOCROTALINA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado a Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Nutrição.

Aprovado em: 9 de dezembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Martine Elisabeth Kienzle Hagen - UFRGS

Nome do professor – instituição

Maria Flávia Marques Ribeiro - UFRGS

Nome do professor - instituição

Alex Sander da Rosa Araujo - UFRGS

Nome do professor – instituição (orientador)

AGRADECIMENTOS

Dedico esse trabalho à minha família, meus pais e irmão, Antônio Carlos, Anelize e Mateus, por estarem sempre ao meu lado, apoiando-me independente de qualquer situação e aos meus avós, Conceição e Antônio, por tornarem possível minha graduação na UFRGS, acolhendo-me enquanto morei em Porto Alegre. Em especial, ao meu querido tio Paulo e minha madrinha Sandra que durante suas vidas sempre me incentivaram nos estudos e a ingressar na UFRGS.

Durante o período da graduação fui cercada de pessoas boas com as quais tive o privilégio de conviver, trocar experiências e construir uma percepção diferente da vida com as vivências que tivemos. Ao longo desses anos enfrentei algumas dificuldades pessoais que afetaram minha vida acadêmica, mas com o apoio de vocês consegui seguir em frente e sou eternamente grata por esses quatro anos e meio que consegui estar perto de amigos de bem e saber que conquistei amizades para a vida toda.

Agradecimento especial também aos professores, alunos de doutorado e colegas do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do ICBS, onde tive a oportunidade de ser iniciação científica e de realizar esse trabalho. Foi uma experiência desafiadora, mas que com a ajuda e disponibilidade de todos tornou-se proveitosa e com muito aprendizado. Obrigada principalmente ao meu orientador professor Alex Sander e co-orientador Patrick pelo apoio sempre que precisei, paciência e empenho em me ensinar.

RESUMO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença caracterizada pela progressiva disfunção endotelial e remodelamento vascular, levando a um quadro de aumento da resistência vascular pulmonar e insuficiência cardíaca direita. O processo inflamatório e o estresse oxidativo são elementos essenciais que contribuem para a fisiopatologia da HAP. Sendo assim, o mirtilo (*blueberry* - BB), o qual apresenta umas das maiores capacidades antioxidantes entre frutas e vegetais, pode ser uma alternativa terapêutica natural na HAP. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato de mirtilo sobre o estresse oxidativo no ventrículo direito (VD) em modelo animal de hipertensão pulmonar. MÉTODOS: 28 ratos machos Wistar (30 dias de idade) foram divididos em três grupos: Controle (CTR), n = 9; Monocrotalina (MCT), n = 10; Monocrotalina + Mirtilo (MCT+BB100), n = 9. Animais dos grupos MCT e MCT+BB100 foram submetidos à HAP pela administração de monocrotalina (60 mg/kg, intraperitoneal). Durante 5 semanas os animais do grupo MCT+BB100 foram tratados com extrato de mirtilo na dose 100 mg/kg/dia via gavagem (14 dias de pré-tratamento - anterior à administração de monocrotalina - e 21 dias de pós-tratamento). No 34º dia de protocolo experimental foi realizado o ecocardiograma dos animais e no 35º dia foi realizada a eutanásia e coleta dos ventrículos direitos para análises bioquímicas e de expressão proteica. RESULTADOS: Hipertrofia ventricular direita foi observada nos animais do grupo MCT em relação ao grupo CTR, explicitada pelo aumento das razões VD/massa corporal e VD/comprimento da tibia, as quais se encontraram atenuadas no grupo MCT+BB100. Comprometimento funcional do VD foi observado nos animais do grupo MCT, os quais apresentaram diminuição da mudança de área fracional e do débito cardíaco, parâmetros restaurados no grupo MCT+BB100. Animais do grupo MCT apresentaram elevada lipoperoxidação e atividade das enzimas NADPH oxidases em relação ao grupo CTR. Verificou-se uma melhora do balanço redox nos animais do grupo MCT+BB100, indicado pela diminuição da lipoperoxidação e da atividade das enzimas NADPH oxidases, bem como aumento da atividade da enzima catalase. Em relação à inflamação, não se observou diferenças na expressão proteica de TLR4 e Myd88 entre os grupos experimentais. CONCLUSÃO: A intervenção com o extrato de mirtilo mitigou os prejuízos funcionais provocados pela HAP através da melhora do estado redox tecidual. Nossos resultados fornecem uma base para pesquisas futuras sobre intervenções com antioxidantes naturais como uma nova estratégia de tratamento na HAP.

Palavras-chave: Hipertensão arterial pulmonar, mirtilo, ventrículo direito, monocrotalina, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a disease characterized by progressive endothelial dysfunction and vascular remodeling, leading to increased pulmonary vascular resistance and right heart failure. The inflammatory process and oxidative stress are essential elements that contribute to the pathophysiology of PAH. Thus, blueberry (BB), which has one of the highest antioxidant capacities between fruits and vegetables, can be a natural therapeutic alternative in PAH. The objective of this work was to evaluate the effect of blueberry extract on oxidative stress in the right ventricle (RV) in an animal model of pulmonary hypertension. **METHODS:** In the present study, 28 male Wistar rats (30 days old) were divided into three groups: Control (CTR), n = 9; Monocrotaline (MCT), n = 10; Monocrotaline + Blueberry (MCT + BB100), n = 9. Animals from the MCT and MCT + BB100 groups were submitted to PAH by the administration of monocrotaline (60 mg/kg, intraperitoneal). For 5 weeks the animals of the MCT + BB100 group were treated with blueberry extract at 100 mg/kg/day dose via gavage (14 days pre-treatment - prior to monocrotaline administration - and 21 days post-treatment). On the 34th day of the experimental protocol the echocardiogram was performed, and one day later the euthanasia and harvest of the right ventricles for biochemical and protein expression analyses were conducted. **RESULTS:** Right ventricular hypertrophy was observed in the animals of the MCT group in relation to the CTR group, indicated by the increase in the RV/body mass and RV/tibia length ratios, which were attenuated in the MCT + BB100 group. Functional impairment of the RV was observed in the animals of the MCT group, which presented decreased fractional area change and cardiac output, parameters restored in the MCT + BB100 group. Animals of the MCT group showed elevated lipid peroxidation and activity of the NADPH oxidase enzyme in relation to the CTR group. An improvement of the redox balance was observed in the animals of the MCT + BB100 group, indicated by reduction of lipoperoxidation and activity of the NADPH oxidase enzyme, as well as an increase in the activity of the catalase enzyme. Regarding inflammation, no differences were observed in the protein expressions of TLR4 and MyD88 between the experimental groups. **CONCLUSION:** The intervention with the blueberry extract mitigated PAH through the improvement of the RV redox state. Our results provide a basis for future research on natural antioxidant interventions as a new treatment strategy in PAH.

Keywords: Pulmonary arterial hypertension, blueberry, right ventricle, monocrotaline, oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Importantes componentes que contribuem para a fisiopatologia da HP.....	16
Figura 2 - Modelo de indução de HAP via administração de monocrotalina (MCT) em ratos.	20
Figura 3 - Geração de EROs na HAP.....	23
Figura 4 - Imagem representativa da <i>Vaccinium spp.</i>	24
Figura 5 - Protocolo experimental do estudo.	28
Figura 6 - Efeitos do extrato de Mirtilo (BB) sobre a hipertrofia cardíaca explicitada como (A) razão VD/MC e (B) razão VD/comprimento da tíbia.....	31
Figura 7 - Efeitos do extrato de Mirtilo (BB) sobre parâmetros funcionais do VD (A) mudança de área fracional (MAF) e (B) débito cardíaco (DC).	32
Figura 8 - Efeitos do extrato de Mirtilo (BB) sobre (A) produção de espécies reativas totais; (B) oxidação lipídica; (C) atividade da enzima NADPH oxidase; (D) expressão proteica da enzima xantina oxidase no ventrículo direito.	33
Figura 9 - Efeitos do extrato de Mirtilo (BB) sobre (A) atividade e expressão proteica da enzima catalase; (B) atividade e expressão proteica da enzima superóxido dismutase Cu/Zn; (C) atividade e expressão proteica da enzima glutationa peroxidase; (D) conteúdo de sulfidrilas no ventrículo direito.	34
Figura 10 - Efeitos do extrato de Mirtilo (BB) sobre a expressão do receptor do tipo Toll 4 (TLR4) no ventrículo direito.	36
Figura 11 – Efeitos do extrato do mirtilo no VD.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação clínica atualizada da hipertensão arterial pulmonar (SIMONNEAU et al., 2019).....	14
Tabela 2 - Principais composto antioxidantes encontrados no mirtilo.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

ADMA – dimetilarginina assimétrica

BB – blueberry

BH₄ – tetrahidrobiopterina

BMPR2 – receptor de proteína morfogenética óssea tipo 2

CAT – catalase

CTR – controle

CYP3A4 – citocromo P450, família 3, subfamília A

DC – débito cardíaco

DCT – doença do tecido conjuntivo

DNA – ácido desoxirribonucleico

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

EO – estresse oxidativo

ERNs – espécies reativas de nitrogênio

EROs – espécies reativas de oxigênio

GMP – guanosina monofostato

GPx – glutathiona peroxidase

GSH – glutathiona reduzida

HAP – hipertensão arterial pulmonar

HAPI – hipertensão arterial pulmonar idiopática

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HP – hipertensão pulmonar

IL-1 β – interleucina-1 β

IL-6 - interleucina-6

MAF – mudança de área fracional

MCT – monocrotalina

MCT + BB100 – monocrotalina + mirtilo

MyD88 – proteína de resposta primária de diferenciação mielóide 88

NF κ B – fator nuclear kappa B

NO – óxido nítrico

Nrf2 – fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

ONOO⁻ - peroxinitrito

QL – quimioluminescência

Sch- HAP – esquistossomose associada a hipertensão arterial pulmonar

SERCA – Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoendoplasmático

SOD – superóxido dismutase

TBOOH – hidróxido de tert-butil

TLR4 – receptor toll-like4

TNF- α – fator de necrose tumoral

VD – ventrículo direito

WU – unidade de wood

XO – xantina oxidase

VE – ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 HIPERTENSÃO PULMONAR – ETIOLOGIA E PATOGENIA	14
1.2 EPIDEMIOLOGIA DA HAP.....	16
1.3 O VENTRÍCULO DIREITO NA HAP	17
1.4 MODELO ANIMAL PARA ESTUDO DA HAP – INDUÇÃO POR MONOCROTALINA.....	19
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO NA HAP	20
1.6 EXTRATO DE MIRTILO	24
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	27
4.2 MORFOMETRIA	28
4.3 ECOCARDIOGRAMA.....	28
4.4 PREPARAÇÃO DO TECIDO	28
4.5 BALANÇO REDOX.....	29
4.5.1 Conteúdo de espécies reativas totais	29
4.5.2 Peroxidação de lipídeos	29
4.5.3 Conteúdo de sulfidrilas.....	29
4.5.4 Atividade da CAT	29
4.5.5 Atividade da GPX	29
4.5.6 Atividade da SOD	30
4.5.7 Atividade da NADPH oxidase.....	30
4.6 EXPRESSÃO PROTEICA (WESTERN BLOT).....	30
4.7 ESTATÍSTICA.....	31
5. RESULTADOS	31
5.1 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DO VENTRÍCULO DIREITO	31
5.2 PARÂMETROS FUNCIONAIS DO VENTRÍCULO DIREITO.....	32
5.3 BALANÇO REDOX NO VENTRÍCULO DIREITO.....	33
5.3.1 Estresse oxidativo.....	33
5.3.2 Defesas antioxidantes.....	34
5.4 INFLAMAÇÃO	36

6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÃO	40
8. REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

1.1 HIPERTENSÃO PULMONAR – ETIOLOGIA E PATOGENIA

A circulação pulmonar apresenta baixa resistência em situação fisiológica e as pressões sanguíneas pulmonares representam a quarta parte das pressões sistêmicas (ABBAS K. ABUL, KUMAR; JON, 2013). A hipertensão pulmonar (HP) é uma condição patológica definida como uma pressão arterial pulmonar média ≥ 25 mmHg em repouso ou > 20 mmHg com resistência vascular pulmonar ≥ 3 WU, sendo caracterizada por alterações cardiopulmonares estruturais, as quais aumentam o fluxo sanguíneo, a pressão pulmonar e a resistência vascular pulmonar, promovendo uma disfunção do ventrículo direito (GALIÈ et al., 2016) (SIMONNEAU et al., 2019).

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) com sua etiologia envolvendo múltiplas condições clínicas e sendo fator para complicação da maioria de doenças cardiovasculares e respiratórias, pode ser clinicamente classificada de acordo com sua origem, sendo ela idiopática (ou primária); secundária (como, por exemplo, presente em decorrência de doenças pulmonares obstrutivas crônicas, êmbolos pulmonares recorrentes, estenose mitral, apneia do sono obstrutiva, infecção por HIV, doenças do tecido conjuntivo e hipertensão portal); hereditária (especialmente envolvendo mutação no gene BMPR-2) ou induzida por drogas como anfetaminas, metanfetaminas e anorexígenos (aminorex, fenfluramina, dexfenfluramina, inibidores seletivos da serotonina) ou toxinas como o óleo de colza (GALIÈ et al., 2016).

Tabela 1 - Classificação clínica atualizada da hipertensão arterial pulmonar (SIMONNEAU et al., 2019).

Classificação clínica da hipertensão arterial pulmonar
1. Idiopática
2. Hereditária <ul style="list-style-type: none"> 2.1 Mutação do gene BMPR2 2.2 Outras mutações
3. Indução por drogas e toxinas
4. Associada com: <ul style="list-style-type: none"> 4.1 Doença do tecido conjuntivo 4.2 Infecção por HIV 4.3 Hipertensão portal 4.4 Doença cardíaca congênita 4.5 Esquistossomose

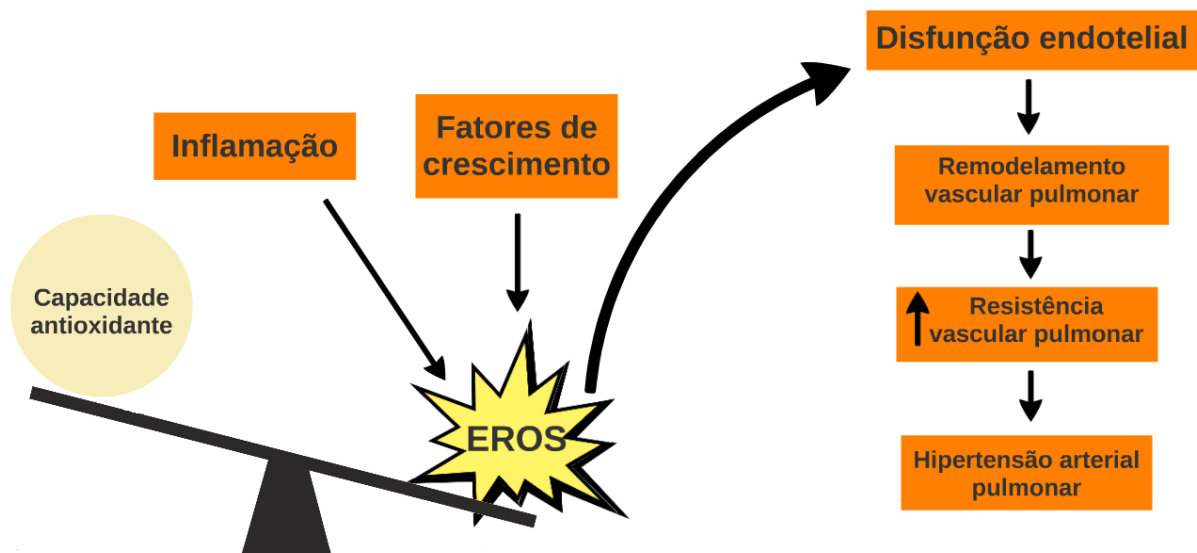
5. Hipertensão arterial pulmonar responsiva a bloqueadores de canais de cálcio a longo prazo
6. Hipertensão arterial pulmonar com características evidentes do envolvimento de vasos venosos e capilares
7. Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido

As características da patogenia da HAP envolvem a disfunção do músculo liso vascular e/ou das células endoteliais pulmonares, culminando no remodelamento da parede dos vasos pulmonares. Na HAP há um processo de redução da síntese de vasodilatadores, como óxido nítrico e prostaciclina, e aumento da síntese de agentes vasoconstritores, como a endotelina e tromboxanos, pelo endotélio da vasculatura pulmonar. Além disso, a maior produção de fatores de crescimento e citocinas inflamatórias que induzem a migração e replicação do músculo liso vascular e a síntese de matriz extracelular contribuem para o quadro da patogenia da doença. Em relação à morfologia dos capilares pulmonares, há alterações vasculares significativas que envolvem a proliferação de células da camada íntima das artérias musculares bem como o espessamento e hipertrofia da camada média das artérias menores e arteríolas levando à diminuição do diâmetro do lúmen vascular. Em estágios mais avançados da doença, podem ocorrer formações de lesões plexiformes, as quais se caracterizam pela extensa proliferação de células endoteliais que invadem a luz do vaso, aumentando ainda mais a resistência pulmonar vascular (ABBAS K. ABUL, KUMAR; JON, 2013).

O processo inflamatório e o estresse oxidativo são elementos essenciais que contribuem para a patogenia da HAP. As principais citocinas inflamatórias que estão aumentadas em pacientes com HAP são a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), os quais levam à produção de fatores de crescimento e ao remodelamento do leito vascular. Esse aumento de citocinas pode estar associado ao estresse oxidativo presente em pacientes com HAP, uma vez que a ativação da cascata de inflamação causa maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (REIS et al., 2013). Além disso, cabe salientar a importante participação do receptor toll-like 4 (TLR4) na doença, uma vez que já se demonstrou que sua ativação nas células do endotélio e no músculo liso vascular induz a produção de citocinas pró-inflamatórias através da ativação do fator nuclear kappa B (NFkB), o qual é ativado pela proteína de reposta primária de diferenciação mieloide 88 (MyD88). As principais citocinas pró-inflamatórias sintetizadas nessa via são: interleucina-1 β (IL-1 β) e TNF- α . Essa resposta inflamatória estabelecida favorece a proliferação das células musculares lisas da artéria pulmonar e o remodelamento vascular pulmonar (YOUNG et al., 2010). O papel dessa via na

HAP está sendo cada vez mais estudado em virtude de seus componentes colaborarem para a progressão da doença. Um estudo recente avaliou o tecido pulmonar de pacientes com HAP idiopática e foi encontrado aumento da expressão da proteína MyD88 quando comparado ao tecido pulmonar de indivíduos saudáveis (PARPALEIX et al., 2016). Outro estudo comparou ratos duplos knock-out para TLR4 e ratos que expressavam constitutivamente TLR4, ambos os grupos expostos a hipóxia crônica, e demonstrou que os animais que possuíam a expressão do receptor desenvolveram HAP, visto que tiveram hipertrofia ventricular direita e aumento da pressão sistólica ventricular direita, em comparação aos ratos com a ausência do receptor, os quais não apresentaram alterações características da HAP (YOUNG et al., 2010).

Figura 1 - Importantes componentes que contribuem para a fisiopatologia da HP.



Fonte: Adaptado e baseado em (AGGARWAL et al., 2013).

Os sintomas da HAP estão relacionados à distribuição anormal do fluxo sanguíneo no leito vascular pulmonar e incluem: dispneia, fadiga, síncope, angina (inicialmente induzidos por esforço e, em casos mais avançados, presentes em repouso), além de distensão abdominal e edema nos membros inferiores refletindo a hipertrofia do ventrículo direito em resposta ao aumento da pós-carga. Apesar das estratégias terapêuticas não resultarem em um prognóstico favorável para os pacientes com HAP, se os sintomas respiratórios não forem tratados a longo prazo com vasodilatadores, agentes antitrombóticos e prostaciclina, os pacientes desenvolvem cianose e insuficiência respiratória severa, resultando em insuficiência cardíaca direita, também denominada *cor pulmonale* (GALIÈ et al., 2016) (ABBAS K. ABUL, KUMAR; JON, 2013).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA HAP

A HAP se caracteriza por ser uma doença rara, possuindo uma prevalência estimada de 15 a 50 casos por milhão de indivíduos. As análises epidemiológicas sistêmicas apresentam

diferentes prevalências dos subtipos de HAP nos hemisférios ocidental e oriental. No ocidente a mais recorrente é a hipertensão arterial pulmonar idiopática (HAPI), representando de 30 a 50% dos casos. Já no oriente constatou-se em sua maioria os casos de HAP associada à doença cardíaca congênita, onde constitui 43% dos casos. Nos últimos anos ocorreu uma transição epidemiológica com o aumento da proporção de pacientes idosos diagnosticados com HAP, principalmente do subtipo HAPI, muitos deles são pacientes com comorbidades associadas como, por exemplo, hipertensão arterial sistêmica, obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e doença cardíaca sistêmica (LAU et al., 2017).

Os dados epidemiológicos internacionais da HAP são variáveis, pois a maioria dos registros feitos inclui majoritariamente pacientes com classificação primária, secundária e hereditária. Além disso, é incluso a população de pacientes prevalentes, o qual indica que o paciente já foi diagnosticado com a doença e está em tratamento, e população de pacientes incidentes (recém-diagnosticados). Apesar de esta distinção ser relevante, pelo fato dos pacientes prevalentes possuírem melhor prognóstico em comparação aos pacientes incidentes, essas variáveis causam maiores vieses nos fatores que afetam a doença, não permitindo identificar as mudanças de fenótipo da HAP (MCGOON et al., 2013b). O perfil dos pacientes com HAP pelo mundo se diferencia conforme o ambiente, a densidade demográfica, o sistema de saúde e saneamento básico (MCGOON et al., 2013a). No Brasil, um estudo foi conduzido com 178 pacientes recém-diagnosticados com média de idade de 46 anos. A proporção de pacientes em cada subgrupo foi: HAPI 28,7%, doença do tecido conjuntivo (DTC) 25,8% e esquistossomose associada HAP (Sch-HAP) 19,7% dos casos. A distribuição das causas da HAP nesse estudo destacou a Sch-HAP, a qual não havia sido citada em nenhum registro Europeu ou Americano. Com isso, evidenciou-se a importância de se obter um registro regional para entender melhor as causas de HAP (ALVES et al., 2015).

1.3 O VENTRÍCULO DIREITO NA HAP

O ventrículo direito (VD) na HAP sofre um remodelamento progressivo. O grau de remodelamento é dependente do estágio da doença pulmonar e sua gravidade, podendo levar ao *cor pulmonale*. Alguns mecanismos presentes na HAP contribuem para o remodelamento do VD, tais como: ativação neuro-humoral (via da angiotensina, down-regulation e dessensibilização de β -receptores), perfusão coronariana e o metabolismo dos cardiomiócitos (aumento da produção mitocondrial de EROs, ativação de vias apoptóticas e inibição da angiogênese) (VONK-NOORDEGRAAF et al., 2013).

Na HP a resistência vascular pulmonar e a pressão pulmonar estão aumentadas, provocando um aumento da pós-carga, a qual ocasiona alterações morfológicas importantes no VD. Inicialmente o VD – que possui uma parede muscular mais fina quando comparada ao ventrículo esquerdo – adapta-se à elevação da pós-carga decorrente da HAP aumentando a espessura de parede e sua contratilidade, em um processo chamado de hipertrofia compensatória. Nesse estágio, há remodelamento concêntrico do ventrículo direito, e a pressão do átrio direito permanece normal. Estruturalmente, a elevação das pressões ventriculares sistólica e diastólica aumentam o estiramento na parede ventricular direita, o que leva inicialmente a um aumento da massa muscular (hipertrofia adaptativa) devido ao aumento da síntese proteica e ao aumento do tamanho dos cardiomiócitos pela adição de sarcômeros. A hipertrofia adaptativa é caracterizada por hipertrofia concêntrica com mínima dilatação ou fibrose. Nessa situação ainda há a manutenção do débito cardíaco (DC) normal em repouso, embora possa haver dificuldades em aumentar o DC no exercício físico (GOLDMAN; AUSIELLO, 2011).

No entanto, o ventrículo direito não pode manter a hipertrofia adaptativa diante da sobrecarga de pressão sustentada causada pela HAP e, eventualmente, há uma transição para a dilatação. Nesse estágio, não há mais aumento da contratilidade ventricular direita, apesar de um aumento adicional da carga, levando ao chamado desacoplamento do ventrículo direito e originando uma fase de hipertrofia cardíaca direita mal adaptativa, determinada por redução significativa da fração de ejeção e diminuição do DC do VD no exercício (RYAN et al., 2015). Os mecanismos que impedem a futura adaptação do ventrículo direito são pouco compreendidos, embora haja cada vez mais evidências de que um desequilíbrio entre a oferta e a demanda de oxigênio para o ventrículo direito desempenhe um papel importante nesse processo, resultando em uma série complexa de alterações nos cardiomiócitos. Uma consequência da dilatação do ventrículo direito é um aumento na tensão da parede, que aumenta a demanda miocárdica de oxigênio e, simultaneamente, diminui a perfusão do ventrículo direito, levando a contratilidade e dilatação ainda mais comprometidas. Outros fatores também foram implicados no declínio progressivo da contratilidade e da insuficiência ventricular direita na HAP, incluindo aumento da ativação simpática crônica, estresse oxidativo e nitrosativo, ativação imune e apoptose de cardiomiócitos (VONK NOORDEGRAAF; GALIE, 2011)

Como a função ventricular direita declina, um aumento no tempo de contração do ventrículo direito e subsequente assincronia ventricular, juntamente com uma diminuição no volume sistólico do ventrículo direito, leva ao comprometimento do ventrículo esquerdo. O enchimento do ventrículo esquerdo também é prejudicado devido ao desenvolvimento de

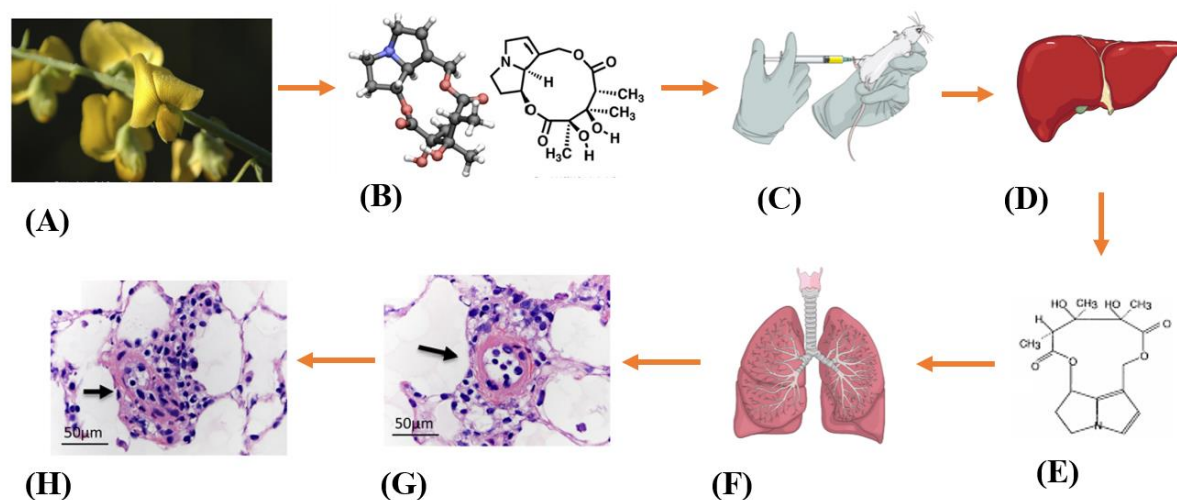
curvatura septal ventricular esquerda, resultante do prolongamento do tempo de contração do ventrículo direito, reduzindo o volume do ventrículo esquerdo durante o início da diástole. Isso, juntamente com a disfunção ventricular direita sistólica e diastólica, contribui para o declínio acentuado do débito cardíaco observado na HAP grave (VONK NOORDEGRAAF; GALIE, 2011).

1.4 MODELO ANIMAL PARA ESTUDO DA HAP – INDUÇÃO POR MONOCROTALINA

A severidade da HAP colaborou para aumentar significativamente o número de estudos nessa área usando modelos animais para melhorar a compreensão do processo progressivo de HP. Os dois principais modelos de estudos com roedores desenvolvidos para investigar a HP envolvem o modelo de exposição crônica à hipóxia e o modelo de lesão vascular pulmonar induzida por monocrotalina (MCT) (STENMARK et al., 2009). A MCT é um alcaloide provindo das sementes da planta *Crotalaria spectabilis*, a qual possui a capacidade de induzir HAP, inicialmente através de um dano endotelial na vasculatura pulmonar, posteriormente levando à hipertrofia do ventrículo direito. Com seu metabolismo dependente do fígado para ser ativado pelas enzimas do citocromo-P450 com reações de dehidroxilação via CYP3A, o metabólito ativo da MCT é formado, sendo chamado de dehidromonocrotalina. A dose de MCT mais comum e que se mostrou efetiva para causar HP foi de 60 mg/kg intraperitoneal (GOMEZ-ARROYO et al., 2012).

Nos modelos de estudo com MCT em ratos, a hipertrofia do ventrículo direito é aparente após 21 dias, tornando-se progressivamente mais grave e a pressão arterial pulmonar se eleva gradualmente após 12 dias, podendo atingir de 60 a 65 mmHg em 28 dias. Se os animais permanecem sem tratamento, a partir da quarta semana a mortalidade começa a ocorrer em virtude da falha do VD (DEMARCO, 2010).

Figura 2 - Modelo de indução de HAP via administração de monocrotalina (MCT) em ratos.



Fonte: Da autora.

Nota: Modelo de indução de HAP via administração de monocrotalina (MCT) em ratos. (A) – imagem da *Crotalearia spectabilis*; (B) – estrutura molecular da MCT; C – injeção intraperitoneal de MCT em ratos Wistar; (D) – metabolização da MCT em dehidromonocrotalina pelo fígado; (E) estrutura molecular do composto ativo dehidromonocrotalina; (F) – MCT induzindo HP ao causar danos na vasculatura pulmonar; (G) – hiperplasia da camada média da vasculatura pulmonar; (H) – proliferação anormal do endotélio com completa oclusão vascular c.

A indução de HAP por MCT resulta em um processo inflamatório caracterizado pelo aumento das concentrações plasmáticas de interleucinas 1 e 6 ocasionando a lesão do endotélio vascular pulmonar, a perda progressiva de proteínas estruturais da membrana celular das células endoteliais pulmonares e a desregulação do mecanismo de sinalização do óxido nítrico (HUANG et al., 2010). Essas alterações provocam o remodelamento do tecido vascular pulmonar típico da doença, em que também é marcante a hiperplasia e hipertrofia das células musculares lisas na artéria pulmonar, contribuindo para a redução do lúmen (SEHGAL; MUKHOPADHYAY, 2007). Além disso, a MCT induz edema alveolar, hiperplasia das células alveolares e, como consequência, a oclusão das veias pulmonares. Também foi descrito que esse alcaloide pode provocar fibrose pulmonar em camundongos (GOMEZ-ARROYO et al., 2012). Portanto, o modelo de monocrotalina é uma estratégia efetiva para se estudar a hipertensão pulmonar e investigar os possíveis métodos de intervenção e/ou tratamento nessa doença.

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO NA HAP

Além dos fatores que estimulam o dano endotelial como o aumento da produção de vasodilatadores e diminuição de vasoconstritores, o estresse oxidativo (EO) possui um papel importante na modulação HAP. O EO está associado à diminuição da capacidade antioxidante das células, evidenciado pela redução da expressão da atividade de enzimas antioxidantes,

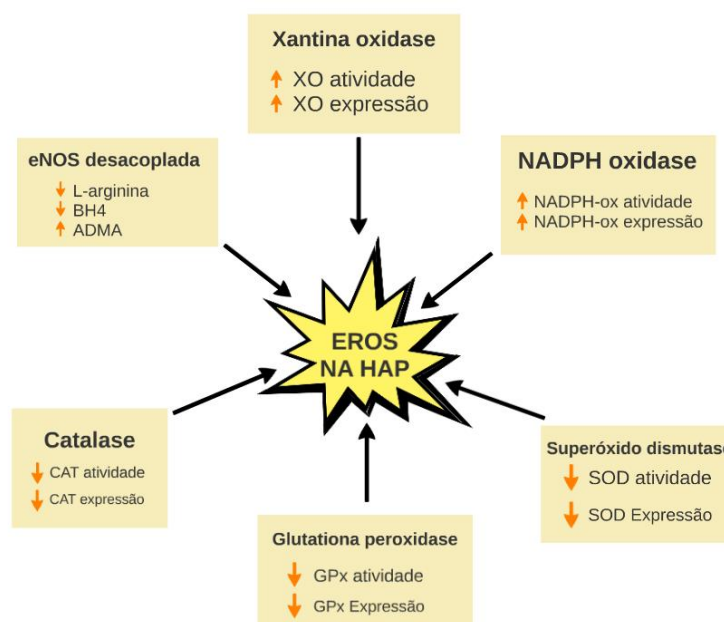
como, por exemplo, a superóxido dismutase (SOD), e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), gerando as principais EROs envolvidas nas vias de sinalização celular: superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (JERNIGAN et al., 2017). O termo EROs inclui radicais livres que são naturalmente formados como subprodutos do metabolismo do oxigênio e a elevada formação de EROs é favorecida quando há um desequilíbrio entre a produção de moléculas altamente reativas e a degradação das mesmas, podendo provocar danos oxidativos ao DNA, às proteínas e reagir com enzimas e lipídeos de membrana. Nesse contexto, podemos ainda salientar o óxido nítrico (NO), o qual em altas concentrações se combina não-enzimaticamente com o superóxido para formar o peroxinitrito ($ONOO^-$), com o O_2 para formar trióxido de dinitrogênio (N_2O_3) ou ainda formar dióxido de nitrogênio (NO_2), dando origem às denominadas espécies reativas de nitrogênio (ERNs), também responsáveis pelo EO (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007). Para impedir o dano oxidativo modulando a alta formação de moléculas oxidantes, as células possuem um sistema antioxidante que incluem as enzimas SOD, catalase (CAT) e a glutaciona-peroxidase (GPx) (NELSON; COX, 2014).

O EO na HAP promove danos aos cardiomiócitos e compromete a sinalização, resultando em disfunção celular ao ativar vias de necrose e/ou apoptose. O aumento dos níveis de EROs que ocorrem na HAP pode prejudicar a contratilidade das células do VD pelo fato de modificarem a expressão de proteínas envolvidas na contração, como a Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoendoplasmático (SERCA) (TÜRCK et al., 2018). No processo de remodelamento ventricular direito, o aumento das EROs pode potencialmente inibir a angiogênese, resultando em isquemia, a qual pode contribuir para a rápida perda de função do VD (RYAN et al., 2015). Além disso, o EO aumentado nos cardiomiócitos do ventrículo direito estimula a ativação de vias de transcrição da hipertrofia e dilatação do VD, favorecendo assim, a insuficiência cardíaca direita (DOS SANTOS LACERDA et al., 2017).

As principais fontes de EROs na vasculatura pulmonar incluem a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) desacoplada, a disfunção mitocondrial e as enzimas NADPH oxidase e a xantina oxidase (XO). A enzima XO favorece a produção de EROs na HAP, especialmente $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , por meio do metabolismo da guanosina monofosfato (GMP). Em um estudo com ratos neonatos expostos a hipóxia crônica foram avaliados os efeitos de inibidores da formação de EROs bem como a atividade da XO. Os resultados demonstraram aumento da atividade dessa enzima em filhotes submetidos à hipóxia, porém, houve uma atenuação no remodelamento vascular pulmonar com a utilização dos inibidores da formação de EROs (JANKOV et al., 2008). A atividade da XO também foi medida no plasma de pacientes com HAP idiopática sem tratamento e apresentou-se aumentada em comparação com pacientes saudáveis, podendo esse

dado indicar a XO como sendo um fator contribuinte para a disfunção endotelial na HAP (SPIEKERMANN; SCHENK; HOEPER, 2009). A enzima NADPH oxidase, por sua vez, catalisa a transferência de um elétron do NADPH para o O_2 formando O_2^- (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007), portanto também contribuindo para a produção de EROS na HAP. Existem cinco isoformas da enzima NADPH oxidase: Nox1, Nox2, Nox3, Nox4 e Nox5, essas sendo expressas em várias células, como células endoteliais, imunes e fibroblastos. No entanto, somente as Nox1, 2 e 4 são mais amplamente estudadas, pois sabe-se que estão presentes em células musculares lisas das artérias pulmonares e que colaboram para a produção de O_2^- na HAP (HUETSCH; SURESH; SHIMODA, 2019). Em um modelo de estudo com MCT em ratos, demonstrou-se um aumento na produção de O_2^- intracelular e na proliferação das células musculares lisas das artérias pulmonares em virtude do aumento da expressão de Nox1 (VEIT et al., 2013). Com relação à Nox2, a qual possui duas subunidades ligadas à membrana ($gp91^{phox}$ e $p22^{phox}$), foi relatado aumento da expressão de $gp91^{phox}$ em ratos MCT. Quanto à Nox4, a inibição farmacológica dessa isoforma foi capaz de prevenir o aumento de hipertrofia do VD e atenuar a progressão da doença em ratos MCT (HUETSCH; SURESH; SHIMODA, 2019).

A vasoconstrição induzida pela diminuição dos níveis de NO endógeno nos vasos pulmonares é um dos principais fatores nos estágios iniciais da HAP. O NO provoca o relaxamento da musculatura lisa dos vasos e sua síntese ocorre a partir do substrato l-arginina principalmente através da enzima eNOS. Seu metabolismo é intimamente regulado pela dimetilarginina assimétrica (ADMA), a qual é uma inibidora endógena da produção de NO e apresenta níveis significativamente elevados na HAP. Do mesmo modo, a baixa disponibilidade de l-arginina e do cofator tetrahydrobiopterina (BH4), essenciais para a geração de NO, favorece o processo de desacoplamento da eNOS, contribuindo para o aumento da geração de EROS na HAP (ZHANG et al., 2015) (AGGARWAL et al., 2013).

Figura 3 - Geração de EROs na HAP.

Fonte: Adaptado de (AGGARWAL et al., 2013).

A diminuição da capacidade antioxidantes na HAP implica diretamente na progressão da doença e é evidenciada pela redução das defesas enzimáticas, entre as quais podemos citar SOD, CAT e GPx. A SOD converte o O_2^- em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo chamada de defesa primária contra o estresse oxidativo, uma vez que o superóxido é um iniciador de reações oxidativas em cadeia. Existem três isoenzimas da SOD: SOD1 (Cu^+-Zn^{2+}) presente no citosol; SOD2 (Mn^{2+}) presente nas mitocôndrias e a SOD3 (Cu^+-Zn^{2+}) encontrada extracelularmente (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007). Como primeira linha de defesa antioxidante, a SOD desempenha um papel importante na proteção da célula reduzindo os níveis de superóxido e, conseqüentemente, aumentando a disponibilidade de NO. Na HP, já foi demonstrado que a expressão da SOD2 está diminuída em pacientes com HAPI (XU et al., 2011). A CAT, por sua vez, reduz o peróxido de hidrogênio, prevenindo a formação de espécies mais reativas, como o radical hidroxil (OH^\cdot) (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007). Estudos mostram que reduções na atividade da CAT estão relacionadas com a progressão da HAP (AGGARWAL et al., 2013). A GPx é da família de enzimas de selênio, sendo um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina. Nas reações catalisadas por essa enzima, os grupos sulfidrilas reativos reduzem o peróxido de hidrogênio à água e as duas moléculas de glutaciona são oxidadas para formar uma única molécula, a glutaciona-dissulfeto (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007). Ainda são escassos estudos com a atividade da GPx na HAP, porém alguns trabalhos sugerem que os níveis de GPx em pacientes com HAP idiopática estão

diminuídos (AGGARWAL et al., 2013). Desse modo, devido à importância do EO no desenvolvimento e na progressão da HAP, é essencial o estudo dos mecanismos pelos quais o dano oxidativo contribui para a doença e das análises de como os componentes antioxidantes colaboram para atenuação da HAP.

1.6 EXTRATO DE MIRTILO

O consumo de pequenas frutas (berries) tem sido fortemente associado à redução de risco cardiovascular devido a sua alta capacidade antioxidante, visto que essas são ricas em compostos fenólicos (HUANG et al., 2016). Os polifenóis apresentam uma variedade de mecanismos de ação: além de sua ação antioxidante também podem interagir com vias que modulam a resposta inflamatória, ativando fatores de transcrição, como o fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) e inibindo o NfκB (COZZOLINO, 2016). Em especial, destaca-se o mirtilo, que pertence à família das *Ericaceae*, gênero *Vaccinium*, o qual é caracterizado por sua composição química contendo elevadas concentrações de polifenóis como ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas e proantocianidinas, e em menores concentrações, carotenoides (JOSEPH; EDIRISINGHE; BURTON-FREEMAN, 2014) (BECKER; KONDA, 2014).

Figura 4 - Imagem representativa da *Vaccinium spp.*



Fonte: disponível na web em: <<https://www.medicalnewstoday.com/articles/287710.php>>

Há variações do conteúdo total de compostos fenólicos e antocianinas entre diferentes variedades de mirtilo, mas a maturação dos frutos na colheita parece afetar positivamente a quantidade desses compostos. A atividade antioxidantes do mirtilo pode variar conforme condições ambientais antes da colheita, estágio de maturação do fruto após a colheita e condições de armazenamento e processamento (REQUE et al., 2014).

Quadro 2 - Principais composto antioxidantes encontrados no mirtilo.

Compostos fenólicos	Ácidos fenólicos: ácido hidroxibezóico e ácido hidroxicinâmico (ácido clorogênico)
	Flavonoides: quercetina e miricetina. Geralmente encontrados na forma de glicosídeos (ligados a um açúcar).
	Antocianinas (pertence ao subgrupo dos flavonoides): pigmento responsável pela cor da fruta. As principais antocianinas encontradas no mirtilo são: cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina e petunidina.
	Protoantocianidinas: procianidina.
Carotenoides	Pigmento presente em concentrações menores, mas sua presença contribui como um precursor do aroma da fruta.

Fonte: Adaptado de (BECKER; KONDA, 2014).

O consumo de mirtilo tem sido relacionado à prevenção e tratamento de doenças crônicas não transmissíveis, como câncer, diabetes mellitus e doenças neurodegenerativas, além de estar relacionado com efeitos benéficos para a visão (REQUE et al., 2014).

Estudos com o extrato de mirtilo demonstraram melhora sobre parâmetros de estresse oxidativo em lesão de cardiomiócitos. *In vitro*, frações fenólicas do mirtilo foram efetivas para prevenir a morte e a hipertrofia das células cardíacas adultas induzidas por noradrenalina. Além disso, foram capazes de melhorar a função contrátil e impedir a redução da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT (MATTERA et al., 2017). Também *in vitro*, outro estudo demonstrou efeitos cardioprotetores do extrato de mirtilo durante um modelo de isquemia-reperfusão em ratos, gerando aumento na captura do radical superóxido, preservando a níveis da glutathiona (GSH) e aumentando a expressão de NOS e Akt (LOPERA et al., 2013). Em um modelo de administração de ciclofosfamida para indução de lesão cardíaca em ratos, os animais tratados com extrato de mirtilo enriquecido com antocianinas apresentaram atenuação da disfunção cardíaca, indicada pela redução da hipertrofia, redução da fibrose do ventrículo esquerdo, diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, aumento de citocinas anti-inflamatórias e de enzimas antioxidantes (MATTERA et al., 2017). As intervenções para o tratamento da HAP ainda se restringem à terapia farmacológica, embora existam estratégias antioxidantes experimentais como, por exemplo, enzimas antioxidantes endógenas clássicas SOD, CAT e GPx, moléculas antioxidantes miméticas e inibidores da geração de EROs (SUZUKI; STEINHORN; GLADWIN, 2013). Contudo, ainda não se demonstrou o uso do

mirtilo ou de intervenções dietoterápicas com alimentos ricos em antioxidantes em pacientes com HAP.

2. JUSTIFICATIVA

A HAP é considerada uma doença com um quadro severo desde o seu diagnóstico e existem várias etiologias para o início do seu desenvolvimento, fazendo com que não exista um tratamento exclusivo ou cura para essa doença. A terapia farmacológica adotada para o tratamento da HAP está baseada em medicamentos com mecanismo de ação vasodilatador, como análogos de prostaciclina e antagonistas do receptor de endotelina. Assim, devido à importância em prevenir essa doença, o interesse em explorar novas abordagens terapêuticas naturais e de fontes alimentares está ganhando notoriedade com a premissa de obter mais benefícios e melhores resultados em relação à proteção contra o estabelecimento da HAP.

Neste sentido, estudar novas estratégias terapêuticas, com potencial antioxidante na dieta, como o extrato de mirtilo, pode melhorar os parâmetros relacionados ao estresse oxidativo no ventrículo direito e pode reduzir as alterações cardiopulmonares que ocorrem na HAP.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do extrato de mirtilo sobre o estresse oxidativo no ventrículo direito no modelo de hipertensão pulmonar.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Analisar os índices de hipertrofia ventricular cardíaca direita através dos parâmetros morfométricos:**
 - VD/massa corporal e VD/comprimento da tíbia.
- **Analisar parâmetros funcionais do ventrículo direito através do ecocardiograma:**
 - Mudança de área fracional (MAF) e débito cardíaco (DC).
- **Analisar o imunoconteúdo (via Western Blot) das seguintes proteínas no ventrículo direito:**
 - Expressão da enzima glutatona peroxidase (GPx 1/2);
 - Expressão da enzima xantina oxidase (XO);
 - Expressão da enzima superóxido dismutase (SOD1);
 - Expressão da enzima catalase (CAT);
 - Expressão do receptor TLR4 (receptor envolvido na inflamação);

- Expressão do Myd88 (modulador da inflamação).
- **Analisar o balanço redox:**
 - Medir conteúdo de espécies reativas totais no tecido ventricular direito (ensaio DCF-DA).
 - Medir a peroxidação de lipídios via técnica de quimioluminescência.
 - Medir o conteúdo de sulfidrilas totais.
 - Medir atividade das enzimas catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx).
 - Medir atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e NADPH oxidase (Nox).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Observação: O trabalho desenvolvido pela aluna Isadora Schein Salvador foi uma parte do projeto de doutorado “AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO DE MIRTILO SOBRE O VENTRÍCULO DIREITO DE RATOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA” do aluno de doutorado (PPG-Fisiologia UFRGS) Patrick Türck. Para o designado trabalho, as amostras de tecido cardíaco direito já se encontram estocadas em freezer -80°C após tratamento dos animais dos diferentes grupos experimentais (CEUA #32192).

Previamente, 28 ratos Wistar machos (30 dias de idade) foram randomizados em três grupos experimentais (Controle - CTR, n=9; Monocrotalina - MCT, n=10; Monocrotalina + Mirtilo - MCT + BB100, n=9). Os animais dos grupos MCT e MCT+BB100 foram submetidos à HAP pela administração de dose única de monocrotalina (60 mg/kg - intraperitoneal), enquanto animais do grupo CTR receberam dose única de salina. Durante 5 semanas os animais do grupo MCT+BB100 foram tratados com extrato de mirtilo na dose 100 mg/kg/dia via gavagem (14 dias de pré-tratamento – pré administração da monocrotalina - e 21 dias de pós-tratamento), enquanto os animais do grupo CTR e MCT receberam água na mesma proporção. No 34º dia de protocolo experimental foi realizado o ecocardiograma e no 35º dia foi realizada eutanásia e coleta dos ventrículos direitos para posterior análises bioquímicas e de expressão proteica (Figura 5).

Figura 5 - Protocolo experimental do estudo.

Fonte: Da autora.

4.2 MORFOMETRIA

Os seguintes índices foram utilizados para avaliação da hipertrofia ventricular direita: peso VD/massa corporal (MC) e peso VD/comprimento da tíbia (YIN et al., 1982).

4.3 ECOCARDIOGRAMA

Para este procedimento, os animais foram anestesiados com a combinação de dois anestésicos cetamina (90 mg/kg, I.P) e xilazina (10 mg/kg, I.P), submetidos à tricotomia da região torácica e colocados em posição de decúbito lateral. As imagens foram obtidas através do modo bidimensional e Doppler pulsátil (Philips HD7 Ultrasound System), com o uso de um transdutor S12-4 (Philips). Foram avaliados a mudança de área fracional (MAF) e o débito cardíaco (DC) do VD.

4.4 PREPARAÇÃO DO TECIDO

O coração foi imediatamente armazenado em nitrogênio líquido após retirado e estocado em freezer (-80°C) até análises. A homogeneização do coração foi realizada por 40 segundos com o homogeneizador de tecidos Ultra-Turrax (OMNI Tissue Homogeneizer, OMNI International, EUA), na presença de KCl 1,15% (5 ml/g de tecido) e fluoreto de fenil metil sulfonil (PMSF) na concentração de 100 mmol/L. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 20 minutos a 10000 g a 4°C. O sobrenadante foi retirado e armazenado em freezer (-80°C) para posteriores análises do estado redox. As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores (LOWRY et al., 1951).

4.5 BALANÇO REDOX

4.5.1 Conteúdo de espécies reativas totais

O método baseia-se na mensuração da fluorescência produzida pela oxidação do DCFH-DA (diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína) pelas espécies reativas de oxigênio presentes na amostra. Para a quantificação, foi utilizada uma curva padrão com concentrações conhecidas de DCF. A fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de excitação (480nm) e emissão (535nm) (LS 55 Fluorescence Spectrometer, Perkin Elmer, MA, EUA). Os resultados foram expressos em pmol de DCF formado/mg de proteína (LEBEL; ISCHIROPOULOS; BONDY, 1992).

4.5.2 Peroxidação de lipídeos

A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da quimioluminescência (QL) conforme descrito por (REPETTO; SEMPRINE; BOVERIS, 2012). A quimioluminescência foi iniciada pela adição de hidróxido de tert-butil (TBOOH) e quantificada em cintilador (LKB Wallac RackBeta Liquid Scintillation Spectrometer 1215, AUS) operando como luminômetro com fototubos sensíveis a emissões na faixa de 380-620 nm. Os resultados foram expressos como CPS/mg proteína.

4.5.3 Conteúdo de sulfidrilas

O conteúdo de sulfidrilas, que representa uma defesa antioxidante não enzimática, está inversamente correlacionado com o dano oxidativo a proteínas. Para o ensaio de sulfidrilas, foram adicionados 0,1 mM de DTNB a 15 uL de amostra, que foram incubados durante 30 min à temperatura ambiente no escuro, tal como descrito (AKSENOV; MARKESBERY, 2001). A absorbância (medição da formação de TNB) foi medida espectrofotometricamente a 412 nm (Anthos Zenyth 200 RT, Biochrom, Reino Unido) e os resultados expressos como nmol TNB/mg proteína.

4.5.4 Atividade da CAT

A atividade da enzima catalase foi determinada espectrofotometricamente observando-se o decaimento da concentração de peróxido de hidrogênio durante 10 minutos. Para esse ensaio, foram utilizados 10 µl de amostra na presença de 995 µl de tampão fosfato 50 mM pH 7,0 com 35 µl de peróxido de hidrogênio. Os resultados foram expressos em consumo de H₂O₂/min/mg proteína.

4.5.5 Atividade da GPX

A atividade de GPx foi medida avaliando a taxa de oxidação de NADPH a 340 nm na presença de glutathiona reduzida (GSH) e enzima glutathiona redutase, usando azida (N₃Na) para

inibição de catalase e hidroperóxido de tert-butil (TBOOH) como o iniciador da reação (MILLS, 1957). Os resultados foram expressos como nmol NADPH/min/mg de proteína.

4.5.6 Atividade da SOD

A técnica para determinação da SOD baseou-se na inibição da reação do ânion radical superóxido com o composto pirogalol. Utilizou-se uma solução tampão (Tris-base 50 mmol/L; EDTA 1 mmol/L, pH 8,2), pirogalol 24 mmol/L (em ácido clorídrico a 10 mmol/L) e catalase 30 μ mol/L. Para se ter o resultado em unidades de SOD, necessita-se de um fator de calibração. Portanto, fez-se necessário a construção de uma curva padrão com concentrações conhecidas de SOD (Superoxide Dismutase from bovine, lyophilized powder, \geq 1500 units/mg protein, Sigma Aldrich, MI, EUA). A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm (Cary 1E UV-Visible Spectrophotometer, Varian, CA, EUA). A atividade da SOD pode ser determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado. Os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína.

4.5.7 Atividade da NADPH oxidase

A atividade da enzima NADPH oxidase foi determinada espectrofotometricamente observando-se o consumo de NADPH a 340 nm durante um intervalo de 20 minutos. Para esse ensaio, foram utilizados 25 μ l de amostra na presença de 925 μ l de tampão fosfato de sódio 100 mM, adicionando-se 50 μ l de NADPH 1 mg/mL (N1630 Sigma Aldrich, MI, EUA) (WEI et al., 2006). Os resultados foram expressos como nmol NADPH/min/mg proteína.

4.6 EXPRESSÃO PROTEICA (WESTERN BLOT)

Para o isolamento das proteínas, as amostras de tecido cardíaco direito foram descongeladas em tampão Tris-EDTA gelado (Tris HCl 100mM, EDTA 5mM, pH=7,4) e homogeneizadas com a utilização do homogeneizador Ultra-Turrax (Tissue Homogeneizer, OMNI International, EUA) em dois pulsos de 15 segundos com intervalos de 10 segundos. Foram adicionados ao tampão aprotinina (10 μ g/ml) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (20 μ M), para prevenir degeneração proteica. As concentrações de proteína foram analisadas e utilizadas para normalizar a quantidade de proteína carregada nos géis (LOWRY et al., 1951).

Foram expostas 100 μ g de proteína à eletroforese de gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando diferentes porcentagens de gel fixador. As proteínas separadas foram transferidas através de eletroforese para membrana usando tampão Towbin modificado, contendo Tris 20mM, glicina 150mM, metanol 20% (V/V), SDS 0,02% (P/V) (pH=8,3) em uma cuba de transferência resfriada. Após, os sítios de proteínas inespecíficas foram bloqueados através de 1 hora de incubação com

solução bloqueadora (5% (P/V) de leite desnatado) em tampão Tris salina 0,1% (P/V), tween-20. As membranas foram processadas por imunodeteção usando os seguintes anticorpos primários: anti-Nrf2, anti-TLR4, anti-MyD88, anti-SOD1, anti-Catalase, anti-Xantina oxidase, anti-Glutationa peroxidase, (Santa Cruz Biotechnology). Os anticorpos primários foram detectados usando os seguintes anticorpos secundários: “goat anti-rabbit ou rabbit anti-goat horseradish peroxidase” e as membranas foram reveladas por quimiluminescência com auxílio do fotodocumentador GE ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, IL, EUA). 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, EUA). Os resultados de cada membrana foram normalizados pelo método de Ponceau (KLEIN et al., 1995).

4.7 ESTATÍSTICA

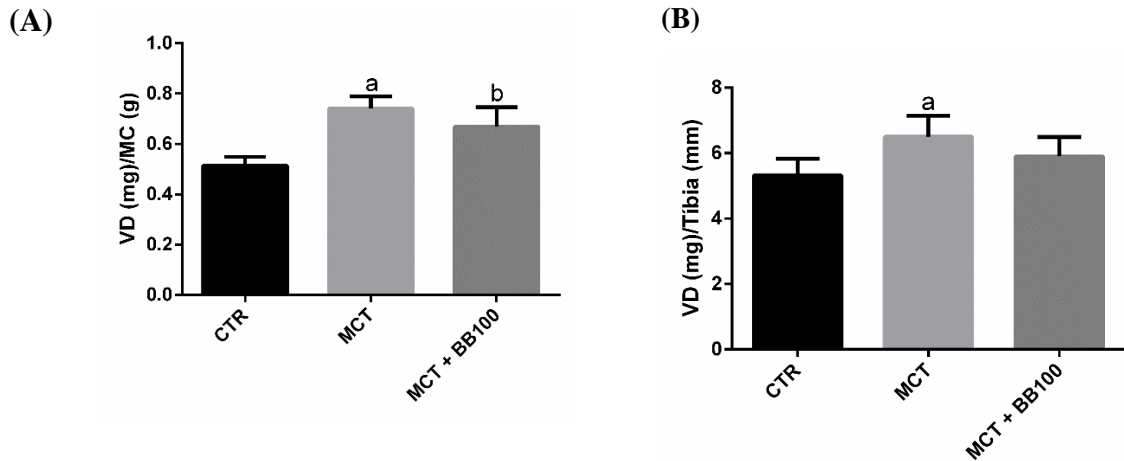
As médias e desvios-padrão foram calculados para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. O teste de Shapiro-Wilk foi usado para determinar a normalidade dos dados. Para os dados com distribuição normal, as comparações foram feitas através de ANOVA de uma via complementada com o pós-teste de Tukey. Kruskal-Wallis foi usado para comparar dados não paramétricos, complementado com o pós-teste de Dunn. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística mostrou $P < 0,05$. O software GraphPad InStat 6.01 para Windows foi utilizado como ferramenta de análise estatística.

5. RESULTADOS

5.1 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DO VENTRÍCULO DIREITO

O tratamento com extrato de mirtilo na dose de 100 mg/kg/dia (MCT + BB100) atenuou os índices de hipertrofia cardíaca direita (VD/massa corporal - MC - e VD/comprimento da tíbia) quando comparado com o grupo MCT (Figura 6).

Figura 6 - Efeitos do extrato de Mirtilo (BB) sobre a hipertrofia cardíaca explicitada como (A) razão VD/MC e (B) razão VD/comprimento da tíbia.

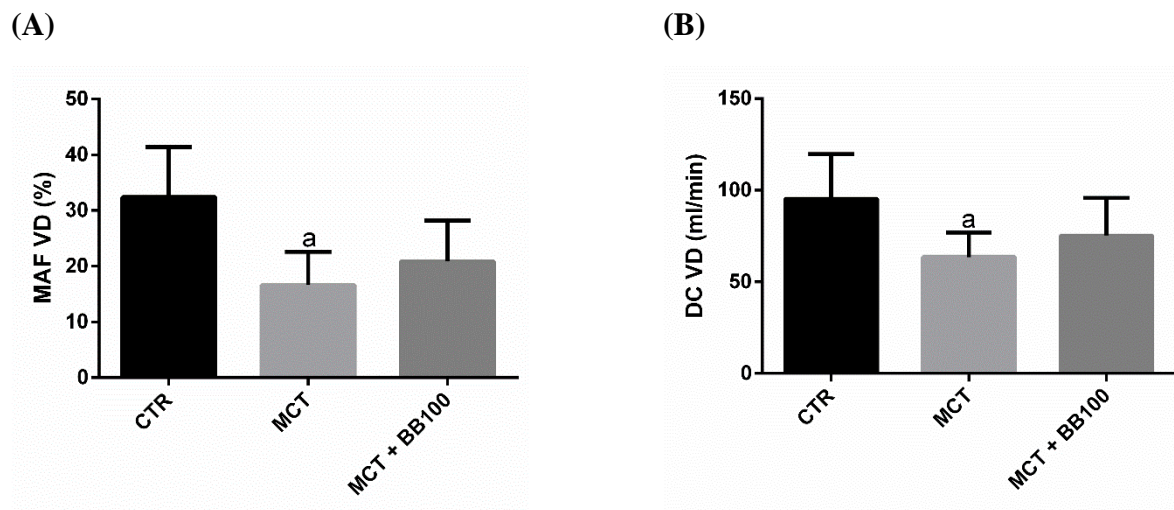


Nota: Grupo Controle (CTR, n = 8), Monocrotalina (MCT, n = 8) e Monocrotalina + Mirtillol (MCT + BB100, n = 7) tratados durante 35 dias via gavagem. Os valores representam a média \pm desvio padrão. ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos. a- diferente de CTR; b- diferente de MCT.

5.2 PARÂMETROS FUNCIONAIS DO VENTRÍCULO DIREITO

Os animais do grupo MCT apresentaram diminuição da mudança de área fracional (MAF) e do débito cardíaco (DC) ventricular direito em comparação com o grupo CTR, enquanto o tratamento com extrato de mirtillol 100 mg/kg/dia melhorou esses parâmetros (Figura 7).

Figura 7 - Efeitos do extrato de Mirtillol (BB) sobre parâmetros funcionais do VD (A) mudança de área fracional (MAF) e (B) débito cardíaco (DC).



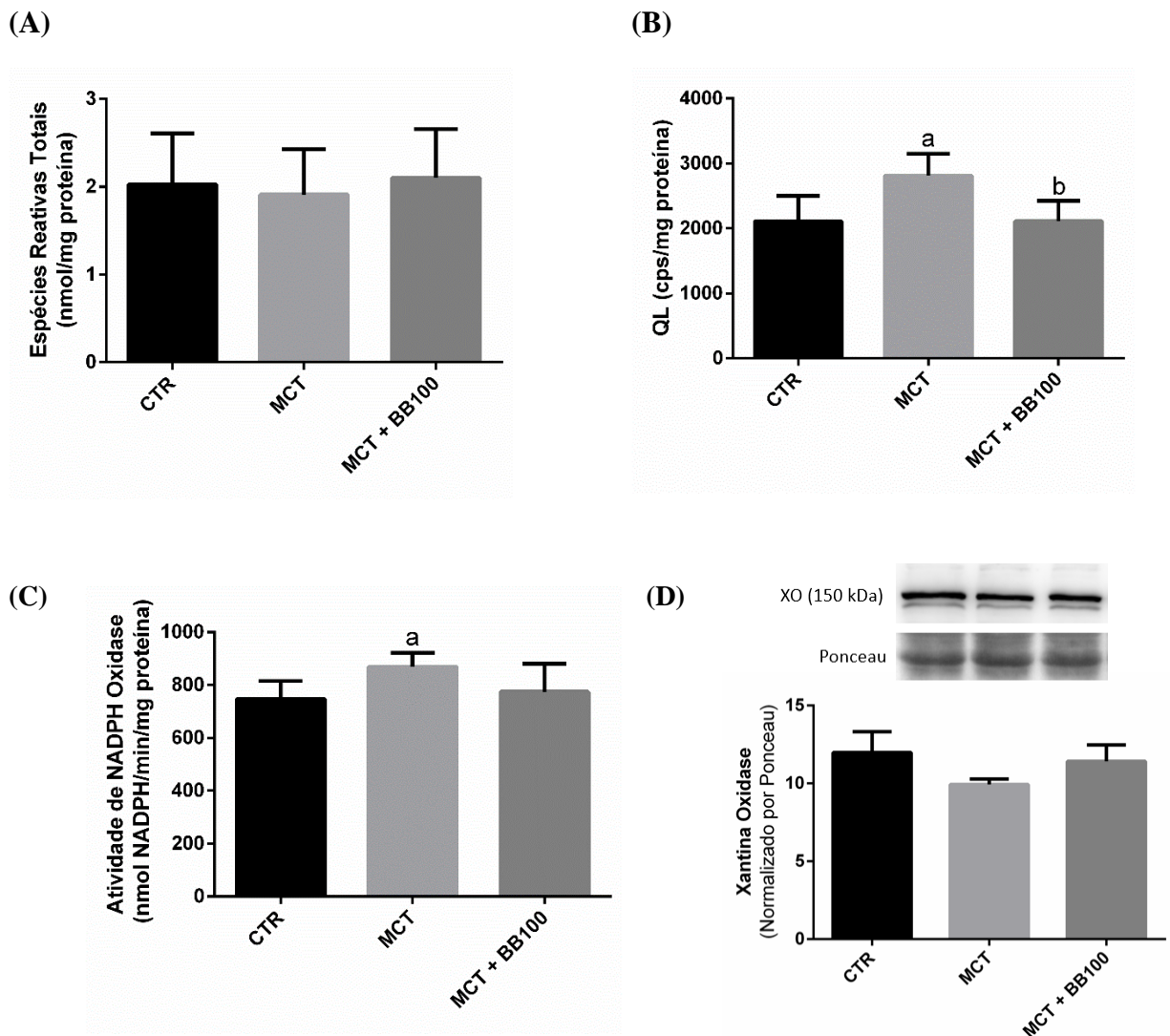
Nota: Grupo Controle (CTR, n = 8), Monocrotalina (MCT, n = 8) e Monocrotalina + Mirtillol (MCT + BB100, n = 8) tratados durante 35 dias via gavagem. Os valores representam a média \pm desvio padrão. ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos. a- diferente de CTR; b- diferente de MCT.

5.3 BALANÇO REDOX NO VENTRÍCULO DIREITO

5.3.1 Estresse oxidativo

Em relação ao conteúdo total de espécies reativas, não se observou diferença entre os grupos experimentais (Figura 8A). No entanto, o tratamento com extrato de mirtilo na dose de 100 mg/kg/dia (MCT + BB100) foi capaz de atenuar o aumento da oxidação lipídica evidenciado no grupo MCT (Figura 8B). Da mesma forma, o tratamento com extrato de mirtilo na dose de 100 mg/kg/dia (MCT + BB100) reduziu a atividade da enzima NADPH oxidase (importante fonte formadora do ânion radical superóxido), a qual se encontra aumentada no grupo MCT (Figura 8C). Não se observou diferenças na expressão da enzima xantina oxidase entre os grupos (Figura 8D).

Figura 8 - Efeitos do extrato de Mirtilo (BB) sobre (A) produção de espécies reativas totais; (B) oxidação lipídica; (C) atividade da enzima NADPH oxidase; (D) expressão proteica da enzima xantina oxidase no ventrículo direito.



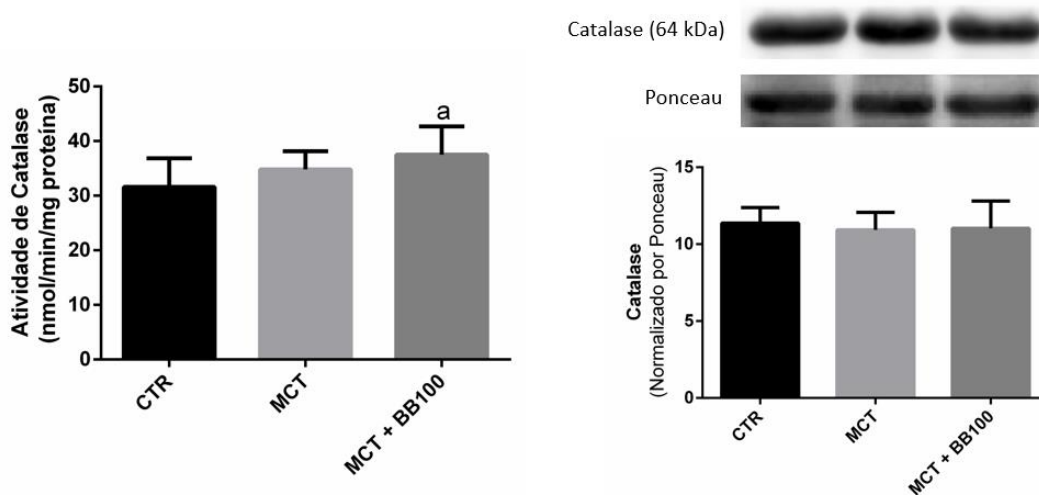
Nota: Animais do grupo Controle (CTR, $n_a = 9$; $n_b = 10$; $n_c = 9$; $n_d = 6$), Monocrotalina (MCT, $n_a = 8$; $n_b = 9$; $n_c = 8$; $n_d = 6$) e Monocrotalina + Mirtilo (MCT + BB100, $n_a = 6$; $n_b = 7$; $n_c = 7$; $n_d = 6$) tratados durante 35 dias via gavagem. Os valores representam a média \pm desvio padrão. ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos para (A), (B) e (C). Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn para (D) - Western Blot. a- diferente de CTR; b- diferente de MCT.

5.3.2 Defesas antioxidantes

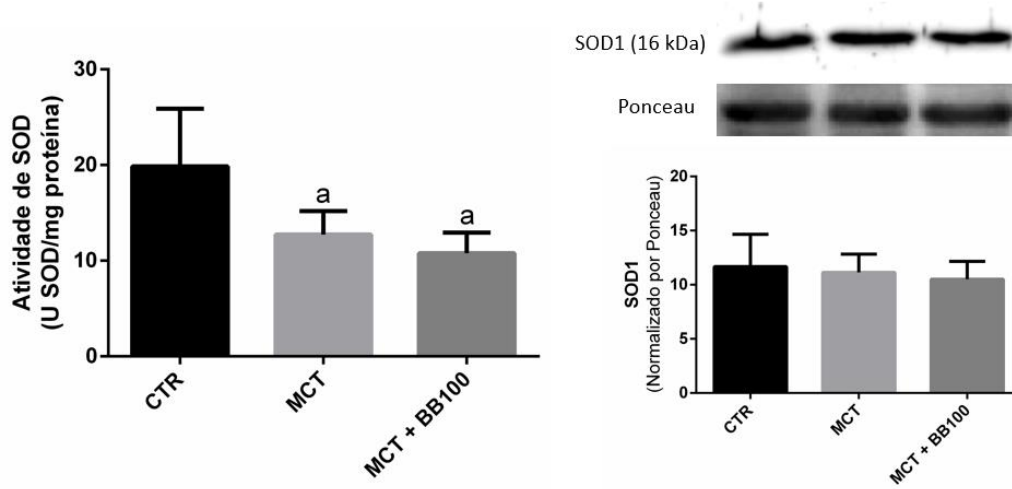
O tratamento com extrato de mirtilo na dose de 100 mg/kg/dia (MCT + BB100) foi capaz de aumentar a atividade da enzima catalase em comparação com o grupo CTR. Porém, não se observou diferenças na expressão proteica entre os diferentes grupos experimentais (Figura 9A). Além disso, a atividade da enzima superóxido dismutase se mostrou reduzida nos grupos MCT +BB100 e MCT em comparação com o grupo CTR. Não se observou diferenças na expressão proteica da enzima SOD1 entre os diferentes grupos experimentais (Figura 9B). Não foram observadas diferenças na atividade e expressão proteicas da enzima glutatona peroxidase, bem como no conteúdo de sulfidrilas entre os diferentes grupos experimentais (Figura 9C e 9D).

Figura 9 - Efeitos do extrato de Mirtilo (BB) sobre (A) atividade e expressão proteica da enzima catalase; (B) atividade e expressão proteica da enzima superóxido dismutase Cu/Zn; (C) atividade e expressão proteica da enzima glutatona peroxidase; (D) conteúdo de sulfidrilas no ventrículo direito.

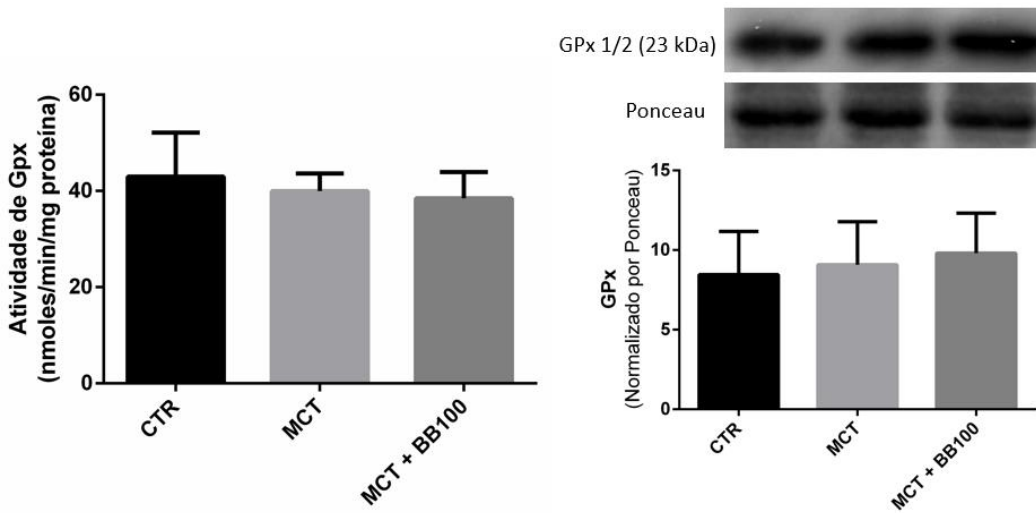
(A)



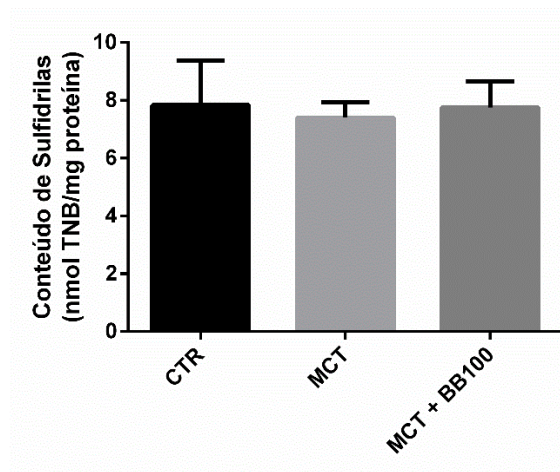
(B)



(C)



(D)

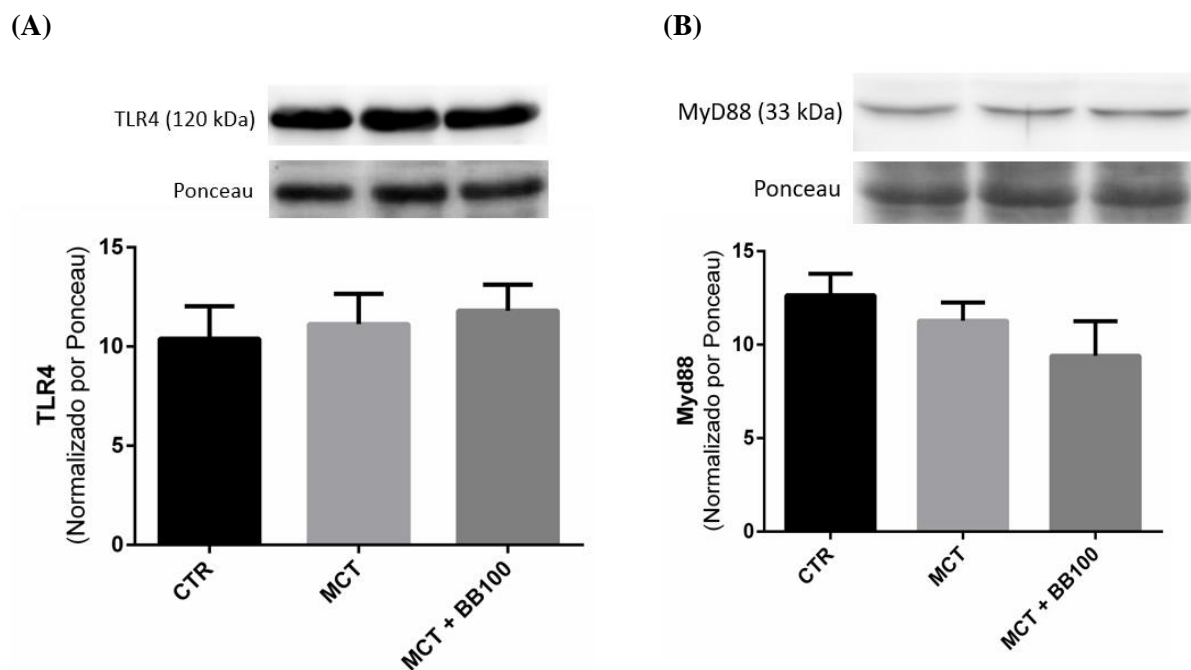


Nota: Animais do grupo Controle (CTR, $n_a = 9$ - atividade enzimática; 6 - Western blot; $n_b = 8$ - atividade enzimática; 6 - Western blot; $n_c = 8$ - atividade enzimática; 6 - Western blot; $n_d = 9$), Monocrotalina (MCT, $n_a = 10$ - atividade enzimática; 6 - Western blot; $n_b = 9$ - atividade enzimática; 6 - Western blot; $n_c = 8$ - atividade enzimática; 6 - Western blot; $n_d = 10$) e Monocrotalina + Mirtilo (MCT + BB100, $n_a = 9$ - atividade enzimática; 6 - Western blot; $n_b = 9$ - atividade enzimática; 6 - Western blot; $n_c = 8$ - atividade enzimática; 6 - Western blot; $n_d = 9$) tratados durante 35 dias via gavagem. Os valores representam a média \pm desvio padrão. ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos para (A), (B), (C) - atividades enzimáticas e (D). Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn para múltiplas comparações entre os grupos para (A), (B) e (C) - Western Blots. a- diferente de CTR; b- diferente de MCT.

5.4 INFLAMAÇÃO

Não se observou diferença na expressão do receptor tipo Toll 4 e da proteína moduladora de inflamação MyD88 entre os diferentes grupos experimentais (Figura 10).

Figura 10 - Efeitos do extrato de Mirtilo (BB) sobre a expressão do receptor do tipo Toll 4 (TLR4) no ventrículo direito.



Nota: Animais do grupo Controle (CTR, $n = 6$), Monocrotalina (MCT, $n = 6$) e Monocrotalina + Mirtilo (MCT + BB100, $n = 6$) tratados durante 35 dias via gavagem. Os valores representam a média \pm desvio padrão. Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn para múltiplas comparações entre os grupos. a- diferente de CTR; b- diferente de MCT.

6. DISCUSSÃO

A HAP é uma doença marcada por alterações cardiopulmonares que aumentam a resistência vascular pulmonar e de forma progressiva levam à disfunção endotelial, associado com o estresse oxidativo e o processo inflamatório, que estimulam o quadro de severidade da doença (ABBAS K. ABUL, KUMAR; JON, 2013), contribuindo assim para a disfunção do VD e levando a uma insuficiência cardíaca direita (GALIÈ et al., 2016). O mirtilo é considerado uma fruta com forte característica antioxidante por possuir altas concentrações de compostos fenólicos e está atrelado à melhora de indicadores de estresse oxidativo em cardiomiócitos

(HUANG et al., 2016). Este estudo, sendo precursor em explorar uma alternativa terapêutica natural para o tratamento da HAP, demonstrou que o extrato do mirtilo foi capaz de promover uma melhora no equilíbrio redox do VD associado à atenuação dos parâmetros funcionais e morfométricos, evidenciados pela diminuição do remodelamento ventricular direito e indicadores de injúria celular, como também o aumento de DC e MAF.

A hipertrofia gradual do VD desenvolvida na HAP pelo aumento de sobrecarga de pressão sustentada leva à redução da fração de ejeção e do DC, essa sendo descrita como hipertrofia mal adaptativa (RYAN et al., 2015). No nosso trabalho, os parâmetros morfométricos evidenciaram o aumento de massa do VD no grupo MCT, comparado ao grupo CTR, concordando com os resultados do estudo de (DE LIMA-SEOLIN et al., 2018). No entanto, no grupo tratado, o extrato de mirtilo foi capaz de atenuar os índices de hipertrofia cardíaca direita, sugerindo uma melhora desse indicativo. Com relação aos parâmetros funcionais do VD, na HAP descompensada há uma diminuição importante do DC, comprometendo a funcionalidade do coração (VONK NOORDEGRAAF; GALIE, 2011). No presente estudo, foi encontrada diminuição na MAF e no DC no grupo MCT comparada ao CTR, enquanto que no grupo tratado, o extrato do mirtilo melhorou as medidas funcionais do VD, indicando menor esforço do coração. A melhora desses fatores no tratamento com o extrato do mirtilo pode ser explicado pelo fato do mirtilo conter em sua composição nutricional compostos fenólicos com potenciais antioxidantes, como apresentado no estudo de (LEE et al., 2017). Lee e colaboradores (2017) descreveram resultados similares ao nosso, nos quais ratos hipertensos com insuficiência cardíaca apresentaram melhora do remodelamento mal adaptativo do ventrículo esquerdo, quando tratados com compostos fenólicos estilbenoides por gavagem. A habilidade de compostos estilbenos, presentes no mirtilo, de atenuar alterações vasculares, assim como de aumentar a sobrevivência celular dos cardiomiócitos em modelo de isquemia cardíaca, quando administrados na dieta, também devem ser relatadas (AHMET et al., 2009). Dessa forma, o mirtilo destaca-se pelo seu papel de protelar a progressão das doenças cardiovasculares em modelos experimentais, principalmente devido à ação antioxidante derivadas de seus componentes químico constituintes com potenciais farmacológicos.

O EO pode provocar sérios danos aos componentes celulares por meio de EROs, sendo resultado da exacerbação da maquinaria enzimática da fosforilação oxidativa, em que existe um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e sua eliminação por um sistema de enzimas antioxidantes (NELSON; COX, 2014). A injúria do endotélio causada pela MCT está associada à concentração aumentada do $O_2^{\cdot-}$, resultando em perda do equilíbrio redox (DEMARCO,

2010). Uma fonte importante de $O_2^{\cdot-}$ na HAP é a enzima NADPH oxidase encontrada nas células musculares lisas das artérias pulmonares, que catalisa a transferência de um elétron do NADPH para o O_2 formando $O_2^{\cdot-}$. Dados da literatura já evidenciaram o aumento da atividade e expressão dessa enzima em modelo de hipertensão em ratos induzida pela MCT (VEIT et al., 2013)(HUETSCH; SURESH; SHIMODA, 2019). Nossos resultados corroboram com resultados previamente apresentados pela bibliografia científica, uma vez que o grupo MCT apresentou maior atividade desta enzima pró-oxidante. Por outro lado, os ratos com hipertensão pulmonar tratados com o extrato de mirtilo demonstraram redução na atividade da NADPH oxidase. Este resultado justifica-se devido ao mirtilo possuir a capacidade antioxidante que inibe a atividade dessa enzima. Nesse contexto, o efeito cardioprotetor do extrato em questão pode ser mediado pelas ações do composto pterostilbeno (um tipo de estilbeno) nele presente, o qual pode ser capaz de reduzir a atividade da NADPH oxidase e, conseqüentemente, diminuir a produção de $O_2^{\cdot-}$ no VD, como já evidenciado em outro estudo no modelo de HAP do nosso grupo de pesquisa (DOS SANTOS LACERDA et al., 2017). A diminuição das ERO's na HAP é de suma importância, pois essas espécies reativas podem inibir os canais de potássio dependentes de voltagem existentes nas artérias pulmonares. Tais canais ao serem ativados, hiperpolarizam a célula fazendo com que haja relaxamento do vaso. Por outro lado, com altas concentrações de ERO's, ocorre um bloqueio desses canais, promovendo vasoconstrição no leito pulmonar (COGOLLUDO et al., 2006). Dessa forma, há um aumento da resistência vascular pulmonar e também da pós-carga no VD, exigindo mais esforço do mesmo. Assim, o interesse no estudo de intervenções que atuam melhorando os mecanismos antioxidantes, a fim de manter a homeostase celular, é fundamental.

O uso do mirtilo está ganhando destaque devido ao seu papel protetor em diversos modelos de doenças cardíacas, como foram evidenciados seus efeitos sobre o EO e defesas antioxidantes. Em um trabalho que induziu hipertrofia cardíaca com isoprelina (agonista β_1) em ratos e utilizou o extrato das folhas da fruta para avaliar seus efeitos (ELADWY et al., 2018) foi demonstrado melhora na atividade da enzima CAT e diminuição da peroxidação lipídica nos grupos tratados com o extrato das folhas do mirtilo, resultado similar ao que encontramos em nosso trabalho nos animais tratados com o extrato de mirtilo. Em nosso estudo, foi encontrada diminuição da peroxidação lipídica no grupo tratado em comparação ao grupo MCT; além disso foi observado que no grupo MCT+BB100 apresentou também aumento da atividade da enzima CAT em comparação ao grupo CRT. Esse resultado sugere que o uso do mirtilo gerou uma proteção antioxidante adicional com o aumento da atividade da enzima CAT, uma vez que a redução dessa enzima está relacionada com a progressão da HAP (AGGARWAL

et al., 2013). Em um outro estudo de lesão cardíaca induzida por ciclofosfamida, que usou extrato de mirtilo enriquecido com antocianinas (LIU et al., 2015) para avaliar a atividade da enzima SOD e GPx, observou-se a melhora da atividade da enzima SOD e da GPx no grupo tratado com o extrato enriquecido. Contudo, no presente estudo, a redução da atividade da SOD, induzida pela hipertensão pulmonar, não foi mitigada pelo tratamento com o extrato de mirtilo. O desencontro com os dados desse estudo pode ser explicado em virtude do protocolo experimental implementado ser distinto, no que se refere a dose do extrato administrada, o tempo de tratamento e o agente indutor do dano cardíaco, caracterizado por acometer com mais severidade o VE, enquanto que a MCT causa dano potencialmente no VD. Além disso, em um modelo de insuficiência cardíaca por deficiência de NO, constatou-se que o VD foi mais submetido a um EO em comparação ao VE juntamente com a incapacidade do VD em regular a SOD2 (SCHRECKENBERG et al., 2015). Esse estudo apresenta uma possível razão para o tratamento do extrato do mirtilo não ser capaz de aumentar a atividade da enzima SOD, visto que na HAP o VD está sob um elevado EO. Com relação à atividade e expressão da enzima GPx, a qual reduz a concentração de peróxido de hidrogênio, em nosso estudo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais. Esse resultado pode ser explicado pelo aumento da atividade de CAT, uma vez que essa enzima é importante no metabolismo do peróxido de hidrogênio, e como consequência disso a CAT poderia estar compensando a atividade da enzima GPx, metabolizando o peróxido de hidrogênio (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007). Existe uma interação entre o estresse oxidativo e o estabelecimento da inflamação na hipertensão pulmonar (WEN et al., 2019).

O processo inflamatório é um componente importante que está envolvido no desenvolvimento e progressão da HAP, visto que a maior produção de citocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , também aumenta a produção de ERO's. A produção dessas citocinas são mediadas pela cascata de inflamação, podendo ser iniciada pelo receptor TLR4 e a proteína MyD88. Em modelo de hipóxia crônica, um estudo demonstrou que os animais que possuíam a expressão do receptor, desenvolveram HAP, apresentando alterações cardiopulmonares em comparação aos ratos com ausência do receptor (YOUNG et al., 2010). Liu e colaboradores observaram aumento da expressão de TLR4 no grupo com lesão cardíaca induzida por ciclofosfamida, enquanto houve diminuição dessa expressão nos grupos tratados com o extrato de mirtilo enriquecido com antocianinas. Nosso trabalho verificou a expressão do receptor TLR4 e da proteína MyD88 no VD, sendo que não houve diferença entre os grupos experimentais. A incompatibilidade com os dados da literatura pode ser explicada de forma que a inflamação seja um fenômeno que se pronuncia mais ativamente no início do

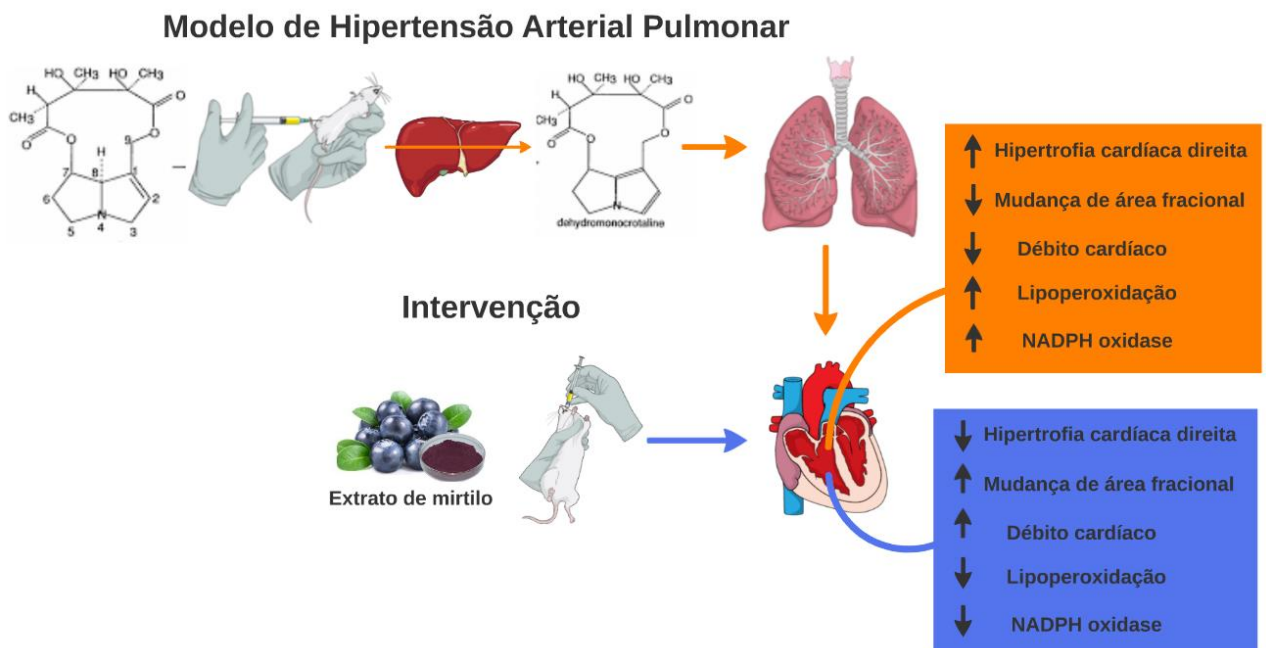
desenvolvimento da HAP; diferentemente, nossa janela temporal de análise foi 21 dias pós-indução com monocrotalina, período no qual os animais possivelmente já não apresentem um quadro inflamatório tão severo.

7. CONCLUSÃO

O uso de antioxidantes naturais tem demonstrado benefícios quando associado às doenças cardiovasculares. Em especial o mirtilo, por apresentar uma elevada capacidade antioxidante com grandes concentrações de compostos fenólicos em sua composição nutricional, pode ser considerado uma alternativa de método terapêutico natural na HAP. Até o presente estudo, intervenções dietoterápicas com alimentos ricos em antioxidantes ainda não haviam sido exploradas na HAP. Com isso, considerando os resultados obtidos, podemos destacar que o extrato de mirtilo atenuou a piora dos parâmetros funcionais do VD na HAP, associado à melhora do estado redox do VD (Figura 11).

Sendo assim, o hábito de uma ingestão regular de alimentos ricos em antioxidantes na dieta, como o mirtilo, pode ser considerada uma estratégia dietoterápica eficaz para promover benefícios e proteção contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares crônicas que comprometem o equilíbrio redox, como é o caso da HAP.

Figura 11 – Efeitos do extrato do mirtilo no VD.



Fonte: Da autora.

8. REFERÊNCIAS

- ABBAS K. ABUL, KUMAR, Vinay; JON, Aster C. Jon. **Patologia Básica**. 9th. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Inc., 2013.
- AGGARWAL, Saurabh et al. Reactive Oxygen Species in Pulmonary Vascular Remodeling. **Comprehensive Physiology**, Hoboken, NJ, USA, v. 3, n. July, p. 1011–1034, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c120024>>. Acesso em: 30 mar. 2019.
- AHMET, Ismayil et al. Blueberry-Enriched Diet Protects Rat Heart from Ischemic Damage. **PLoS ONE**, São Paulo, v. 4, n. 6, p. e5954, 2009. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0005954>>. Acesso em: 15 maio. 2019.
- AKSENOV, Michael Y.; MARKESBERY, William R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, Lexington, v. 302, n. 2–3, p. 141–145, 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394001016366>>
- ALVES, Jose Leonidas et al. Pulmonary Arterial Hypertension in the Southern Hemisphere. **Chest**, São Paulo, v. 147, n. 2, p. 495–501, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1378/chest.14-1036>>. Acesso em: 12 nov. 2018.
- BECKER, Paula; KONDA, Pertuzatti. **Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity in Blueberry Species produced in Brazil**. 2014. Tese doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.
- COGOLLUDO, ANGEL et al. Role of Reactive Oxygen Species in Kv Channel Inhibition and Vasoconstriction Induced by TP Receptor Activation in Rat Pulmonary Arteries. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Madrid, v. 1091, n. 1, p. 41–51, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1378.053>>. Acesso em: 2 nov. 2019.
- COZZOLINO, Silvia. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 5 ed ed. Barueri, SP: Manole, 2016.
- DE LIMA-SEOLIN, Bruna Gazzi et al. Bucindolol attenuates the vascular remodeling of pulmonary arteries by modulating the expression of the endothelin-1 A receptor in rats with pulmonary arterial hypertension. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Porto Alegre, v. 99, p. 704–714, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332217363163>>. Acesso em: 16 maio. 2019.

DEMARCO, Vincent G. Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. **World Journal of Cardiology**, Missouri, v. 2, n. 10, p. 316, 2010. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1949-8462/full/v2/i10/316.htm>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

DOS SANTOS LACERDA, Denise et al. Pterostilbene reduces oxidative stress, prevents hypertrophy and preserves systolic function of right ventricle in cor pulmonale model. **British Journal of Pharmacology**, Port, v. 174, n. 19, p. 3302–3314, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/bph.13948>>. Acesso em: 25 jun. 2019.

ELADWY, Radwa A. et al. Mechanistic insights to the cardioprotective effect of blueberry nutraceutical extract in isoprenaline-induced cardiac hypertrophy. **Phytomedicine**, Cairo, v. 51, n. September, p. 84–93, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.10.009>>. Acesso em: 5 ago. 2019.

GALIÈ, Nazzareno et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. **European Heart Journal**, Bologna, v. 37, n. 1, p. 67–119, 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/eurheartj/article-lookup/doi/10.1093/eurheartj/ehv317>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

GOLDMAN, Lee; AUSIELLO, Dennis. **Cecil Medicina**. 23^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2011.

GOMEZ-ARROYO, J. G. et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. **AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology**, Amsterdam, v. 302, n. 4, p. 7, 2012. Disponível em: <<http://ajplung.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajplung.00212.2011>>. Acesso em: 20 dez. 2018.

HUANG, Haohai et al. Effects of Berries Consumption on Cardiovascular Risk Factors: A Meta-analysis with Trial Sequential Analysis of Randomized Controlled Trials. **Scientific Reports**, Guangdong, v. 6, n. 1, p. 23625, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep23625>>. Acesso em: 25 mar. 2019.

HUANG, Jing et al. Progressive endothelial cell damage in an inflammatory model of pulmonary hypertension. **Experimental Lung Research**, Valhalla, v. 36, n. 1, p. 57–66, 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/01902140903104793>>

HUETSCH, John; SURESH, Karthik; SHIMODA, Larissa. Regulation of Smooth Muscle Cell Proliferation by NADPH Oxidases in Pulmonary Hypertension. **Antioxidants**, Baltimore, v. 8, n. 3, p. 56, 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3921/8/3/56>>. Acesso em: 21

nov. 2018.

JANKOV, Robert P. et al. Contribution of xanthine oxidase-derived superoxide to chronic hypoxic pulmonary hypertension in neonatal rats. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, Toronto, v. 294, n. 2, p. L233–L245, 2008. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.00166.2007>>. Acesso em: 10 out. 2019.

JERNIGAN, Nikki L. et al. Contribution of reactive oxygen species to the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. **PLOS ONE**, Albuquerque, v. 12, n. 6, p. e0180455, 2017. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0180455>>. Acesso em: 30 nov. 2018.

JOSEPH, Shama V.; EDIRISINGHE, Indika; BURTON-FREEMAN, Britt M. Berries: Anti-inflammatory Effects in Humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Illinois, v. 62, n. 18, p. 3886–3903, 2014. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf4044056>>. Acesso em: 5 dez. 2018.

D. KLEIN, R.M. Kern, R.Z. Sokol, A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. **Biochem. Mol. Biol. Int.** 36 (1) (1995) 59–66.

LAU, Edmund M. T. et al. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. **Nature Reviews Cardiology**, Le Kremlin-Bicêtre, v. 14, n. 10, p. 603–614, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2017.84>>. Acesso em: 10 maio. 2019.

LEBEL, Carl P.; ISCHIROPOULOS, Harry; BONDY, Stephen C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, Birmingham, v. 5, n. 2, p. 227–231, 1992. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/tx00026a012>>. Acesso em: 7 maio. 2019.

LEE, Danielle et al. Peripheral and Cerebral Resistance Arteries in the Spontaneously Hypertensive Heart Failure Rat: Effects of Stilbenoid Polyphenols. **Molecules**, Winnipeg, v. 22, n. 3, p. 380, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/22/3/380>>. Acesso em: 2 nov. 2019.

LIU, Yunen et al. Blueberry Anthocyanins-Enriched Extracts Attenuate Cyclophosphamide-Induced Cardiac Injury. **PLOS ONE**, Hawaii, v. 10, n. 7, p. e0127813, 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0127813>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

LOPERA, Yasmin E. et al. Antioxidant Activity and Cardioprotective Effect of a Nonalcoholic Extract of *Vaccinium meridionale* Swartz during Ischemia-Reperfusion in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Argentina, v. 2013, p. 1–10, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/516727>>. Acesso em: 13 maio. 2019.

LOWRY, Oliver H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Missouri, v. 193, p. 265–275, 1951. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/193/1/265.short#ref-list-1>>. Acesso em: 7 maio. 2019.

MATTERA, Rosanna et al. Effects of Polyphenols on Oxidative Stress-Mediated Injury in Cardiomyocytes. **Nutrients**, Roma, v. 9, n. 5, p. 523, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6643/9/5/523>>. Acesso em: 27 out. 2018.

MCGOON, Michael D. et al. Pulmonary Arterial Hypertension : Epidemiology and Registries. **American College of Cardiology**, Rochester, v. 62, n. 1, p. 21–26, 2013. a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2013.10.023>>. Acesso em: 3 nov. 2018.

MCGOON, Michael D. et al. Pulmonary Arterial Hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, Rochester, v. 62, n. 25, p. D51–D59, 2013. b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073510971305866X>>. Acesso em: 3 nov. 2018.

MILLS, Gordon C. Hemoglobin Catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. In: INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (Ed.). **Journal of Biological Chemistry**. Cambridge: Cambridge University Press, 1957. v. 229p. 189–197.

NELSON, David L.; COX, Michael M. Princípios de bioquímica de Lehninger. **Journal of Shoulder and Elbow Surgery**, Porto Alegre, v. 20, n. 6, p. 1250, 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1058274611001170>>. Acesso em: 30 out. 2018.

PARPALEIX, Aurélien et al. Role of interleukin-1 receptor 1/MyD88 signalling in the development and progression of pulmonary hypertension. **European Respiratory Journal**, Orleans, v. 48, n. 2, p. 470–483, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1183/13993003.01448-2015>>. Acesso em: 12 dez. 2018.

REIS, Graziela S. et al. Oxidative-Stress Biomarkers in Patients with Pulmonary Hypertension. **Pulmonary Circulation**, São Paulo, v. 3, n. 4, p. 856–861, 2013. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1086/674764>>. Acesso em: 13 nov. 2018.

REPETTO, Marisa; SEMPRINE, Jimena; BOVERIS, Alberto. Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. In: CATALA, Angel (Ed.). **Lipid Peroxidation**. 1^a ed. Argentina: InTech, 2012. p. 3–30.

REQUE, Priscilla Magro et al. Characterization of blueberry fruits (*Vaccinium* spp.) and derived products. **Food Science and Technology (Campinas)**, Porto Alegre, v. 34, n. 4, p. 773–779, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612014000400019&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 26 nov. 2018.

RYAN, John J. et al. Right Ventricular Adaptation and Failure in Pulmonary Arterial Hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, Ontario, v. 31, n. 4, p. 391–406, 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0828282X15000586>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

SCHRECKENBERG, Rolf et al. Specific Mechanisms Underlying Right Heart Failure: The Missing Upregulation of Superoxide Dismutase-2 and Its Decisive Role in Antioxidative Defense. **Antioxidants & Redox Signaling**, Giessen, v. 23, n. 15, p. 1220–1232, 2015. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2014.6139>>. Acesso em: 20 jan. 2019.

SEHGAL, Pravin B.; MUKHOPADHYAY, Somshuvra. Dysfunctional Intracellular Trafficking in the Pathobiology of Pulmonary Arterial Hypertension. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, Valhalla, v. 37, n. 1, p. 31–37, 2007. Disponível em: <<http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2007-0066TR>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

SIMONNEAU, Gérald et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. **European Respiratory Journal**, Le Kremlin-Bicêtre, v. 53, n. 1, p. 1801913, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1183/13993003.01913-2018>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

SMITH, Colleen; MARKS, Allan D.; LIEBERMAN, Michael. **Bioquímica Médica Básica de Marks**. 2^a ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

SPIEKERMANN, S.; SCHENK, K.; HOEPER, M. M. Increased xanthine oxidase activity in idiopathic pulmonary arterial hypertension. **European Respiratory Journal**, Hannover, v. 34, n. 1, p. 276–276, 2009. Disponível em:

- <<http://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.00013309>>. Acesso em: 27 mar. 2019.
- STENMARK, Kurt R. et al. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, Aurora, v. 297, n. 6, p. L1013–L1032, 2009. Disponível em: <<http://ajplung.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajplung.00217.2009>>. Acesso em: 24 nov. 2018.
- SUZUKI, Yuichiro J.; STEINHORN, Robin H.; GLADWIN, Mark T. Antioxidant Therapy for the Treatment of Pulmonary Hypertension. **Antioxidants & Redox Signaling**, Washington, v. 18, n. 14, p. 1723–1726, 2013. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2013.5193>>. Acesso em: 13 abr. 2019.
- TÜRCK, Patrick et al. Trapidil improves hemodynamic, echocardiographic and redox state parameters of right ventricle in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Porto Alegre, v. 103, n. January, p. 182–190, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.001>>. Acesso em: 5 jan. 2019.
- VEIT, Florian et al. Function of NADPH Oxidase 1 in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells After Monocrotaline-Induced Pulmonary Vascular Remodeling. **Antioxidants & Redox Signaling**, Giessen, v. 19, n. 18, p. 2213–2231, 2013. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2012.4904>>. Acesso em: 12 abr. 2019.
- VONK-NOORDEGRAAF, Anton et al. Right Heart Adaptation to Pulmonary Arterial Hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, Amsterdam, v. 62, n. 25, p. D22–D33, 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109713058701>>. Acesso em: 6 nov. 2018.
- VONK NOORDEGRAAF, A.; GALIE, N. The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension. **European Respiratory Review**, Bologna, v. 20, n. 122, p. 243–253, 2011. Disponível em: <<http://err.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09059180.00006511>>. Acesso em: 7 dez. 2018.
- WEI, Yongzhong et al. Angiotensin II-induced NADPH Oxidase Activation Impairs Insulin Signaling in Skeletal Muscle Cells. **Journal of Biological Chemistry**, Arizona, v. 281, n. 46, p. 35137–35146, 2006. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M601320200>>. Acesso em: 12 abr. 2019.
- WEN, Juan et al. Original Article DHT deteriorates the progression of monocrotaline-induced

pulmonary arterial hypertension : effects of endogenous and exogenous androgen. **American Journal of Translational Research**, Hunan, v. 11, n. 9, p. 5752–5763, 2019.

XU, Dachun et al. Exacerbated Pulmonary Arterial Hypertension and Right Ventricular Hypertrophy in Animals With Loss of Function of Extracellular Superoxide Dismutase. **Hypertension**, Minnesota, v. 58, n. 2, p. 303–309, 2011. Disponível em: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.166819>>. Acesso em: 12 jun. 2019.

YIN, F. C. P. et al. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, Baltimore, v. 243, n. 6, p. H941–H947, 1982. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.1982.243.6.H941>>. Acesso em: 7 maio. 2019.

YOUNG, Karen C. et al. Toll-like receptor 4–deficient mice are resistant to chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. **Experimental Lung Research**, Miami, v. 36, n. 2, p. 111–119, 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/01902140903171610>>. Acesso em: 3 maio. 2019.

ZHANG, Shuai et al. Oxidative stress and nitric oxide signaling related biomarkers in patients with pulmonary hypertension: a case control study. **BMC Pulmonary Medicine**, Beijing, v. 15, n. 1, p. 50, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12890-015-0045-8>>. Acesso em: 28 mar. 2019.