

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

TESE DE DOUTORADO

Alterações redox e mitocondriais induzidas pela hipertensão arterial pulmonar e alternativas terapêuticas com vesículas extracelulares derivadas de células mesenquimais e superexpressão da MnSOD

Autora: Giana Blume Corssac
Orientadora: Dra. Adriane Belló Klein

Porto Alegre, março de 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Giana Blume Corssac

Alterações redox e mitocondriais induzidas pela hipertensão arterial pulmonar e alternativas terapêuticas com vesículas extracelulares derivadas de células mesenquimais e superexpressão da MnSOD

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), como requisito para obtenção do grau de Doutora em Fisiologia.

Orientadora: Dra. Adriane Belló Klein

Porto Alegre, março de 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Guilherme Baldo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Departamento de Fisiologia

Prof. Dr. Pedro Leme Silva

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Departamento de Biofísica e Fisiologia

Prof. Dr. José Geraldo Mill

Universidade Federal do Espírito Santo

Departamento de Ciências Fisiológicas

AGRADECIMENTOS

Esta tese não é fruto de um trabalho apenas individual, ou feita somente dos momentos de trabalho e análises de resultados. Ela é uma soma de todos os caminhos e pessoas que me fizeram chegar até aqui, que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus pais, Vera e Paulo, por me mostrarem o valor do estudo desde cedo e fazerem sempre o possível e o impossível para que eu e meus irmãos tivéssemos uma educação de qualidade. Obrigada por apoiarem todas as minhas escolhas, pelo suporte até mesmo nos momentos mais difíceis e, principalmente, pelo amor que recebo todos os dias.

Aos meus irmãos, Caio e Carol, pela parceria, apoio e amizade. Obrigada por compartilharem a vida e tantas memórias felizes comigo.

Ao meu namorado Ricardo, que acompanha minhas conquistas desde que me formei biomédica e é, desde então, meu companheiro em qualquer situação. Agradeço muito por sempre me incentivar, por me apoiar mesmo à distância e pela paciência e compreensão nos momentos difíceis. Obrigada por estar sempre ao meu lado e sonhar alto comigo.

Aos meus cunhados, Ana, Leonardo e Renata, pela amizade e ótimos momentos, principalmente nestes últimos dois anos.

Aos meus amigos, Rafa, Paula, Thaís, Leo, Eduardo, Luana, Duda, Patrícia, Nicolli e tantos outros que fazem parte da minha vida. Sorte a minha em ter tantas pessoas especiais a quem agradecer e tantas boas histórias para contar. Agradeço por todas as palavras de apoio, por entenderem minha ausência em alguns momentos e por serem estas pessoas incríveis que me inspiram a ser sempre melhor.

À UFRGS, pelos mais de 10 anos me proporcionando a melhor educação, e por ser um lugar onde conheci pessoas e vivi experiências incríveis. Estendo este agradecimento a todos os funcionários da universidade, que são essenciais para a UFRGS continuar sendo uma instituição de excelência.

Às agências de fomento à pesquisa do Brasil: ao CNPq, que financiou minhas bolsas de estudo no mestrado e no doutorado, e à CAPES, que me contemplou com a bolsa e a oportunidade de fazer doutorado sanduíche no exterior.

À banca examinadora, formada por professores que admiro, que prontamente se disponibilizaram para contribuir no aperfeiçoamento desta tese.

Ao PPG Fisiologia e aos professores, pela oportunidade de obter meu título de mestre e, agora (se tudo der certo), de doutora em fisiologia, mas principalmente por tudo que aprendi nestes 6 anos.

Ao Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, onde aprendi a ser pesquisadora desde a iniciação científica e onde tive a oportunidade de conhecer e conviver com muitas pessoas admiráveis.

Dentre estes, gostaria de fazer um agradecimento especial ao professor Alex Araújo, que é um exemplo de pesquisador e de professor apaixonado pela profissão, e me ensinou muito durante todos estes anos, sobre fisiologia, prática de laboratório e ética no trabalho.

Aos professores Paulo Schenkel e Alexandre de Castro, pelos ensinamentos, pelas conversas e por serem exemplos na pesquisa científica.

À Tânia Fernandes Piedras, que é um pilar no laboratório, sem a qual muitos projetos não se desenvolveriam da mesma forma. Agradeço muito por sempre ter me acolhido, me apoiado e me defendido. Agradeço, também, por ser uma pessoa tão especial e por todo o carinho e amizade em todos esses anos.

Aos colegas e amigos do laboratório, por todos os ótimos momentos que passamos juntos e por fazerem nosso ambiente de trabalho ser leve e divertido. Um agradecimento especial às amigas que contribuíram para este trabalho, Jéssica Bonetto e Cristina Campos-Carraro, pela amizade, bons momentos e ajuda essencial durante o desenvolvimento do experimento I, e aos amigos Vanessa Ortiz e Patrick Türck, pelos momentos de desabafo, parceria e trocas de conhecimento. Agradeço, também, ao Rafael Fernandes, Alexandra Zimmer, Bruna Lima-Seolin, Denise Lacerda, Alexandre Hickmann e todos que fizeram parte desta jornada.

À professora Ionara Siqueira e sua aluna Laura Reck, que nos mostraram o potencial das vesículas extracelulares e nos auxiliaram nesta parte importante do projeto.

Ao professor Guilhian Leipnitz e seus alunos Belisa Parmeggiani e Mateus Grings, que nos auxiliaram com as análises mitocondriais realizadas no experimento I, bem como na revisão do artigo.

Ao Dr. Ruhul Abid, por me receber no seu laboratório durante meu período de doutorado sanduíche, por apoiar minha ideia de pesquisa desde o início e dar todo o suporte para o desenvolvimento dos experimentos II e III. Agradeço por ter feito me sentir parte do laboratório desde que cheguei lá até hoje, por confiar em mim e me instigar a ser uma pesquisadora melhor.

Ao Dr. Frank Selke, por também me receber em seu laboratório, e ao Dr. Olin Liang, pela consultoria durante o desenvolvimento do projeto e pelas palavras de apoio e incentivo.

À Catherine Karbasiafshar, por ter sido minha parceira durante o doutorado sanduíche, me apoiando em todos os meus experimentos no laboratório. Agradeço por ter deixado a rotina de trabalho leve, pelos almoços e caronas, e pela amizade.

À Rayane Teixeira, que foi e ainda é essencial para o desenvolvimento dos experimentos II e III, que me acolheu nos Estados Unidos e deu toda a ajuda possível para que este projeto saísse do papel, mesmo estando sobrecarregada com o próprio projeto e a rotina do laboratório. Obrigada pela parceria, pelos ensinamentos e, principalmente, pela amizade.

À minha orientadora, professora Adriane Belló Klein, eu gostaria de dedicar um agradecimento especial. Sou muito grata pela oportunidade de fazer parte do laboratório desde 2012, quando fui fazer iniciação científica, e ser orientada desde então por uma pessoa tão especial. Se cheguei até aqui foi porque tive como exemplo uma profissional brilhante, professora dedicada e pesquisadora de prestígio, como a professora Adriane. Muito obrigada pela confiança no meu trabalho, por estar sempre presente e, ao mesmo tempo, me deixar evoluir de forma independente, pelo respeito, por tudo que me ensinou, pela compreensão nos momentos difíceis e pelos sábios conselhos de vida.

Por fim, gostaria de dedicar este trabalho a todos os pesquisadores brasileiros, que continuam produzindo conhecimento e se dedicando a fazer ciência neste país, mesmo com os constantes ataques, descrédito e cortes de investimentos feitos nos últimos anos pelo atual governo.

Resumo

Introdução: Sendo uma doença caracterizada pelo aumento da resistência vascular pulmonar e disfunção cardíaca direita, a hipertensão arterial pulmonar (HAP) também é marcada pela perturbação da homeostase redox e mitocondrial. **Objetivo:** Este trabalho teve como objetivo a investigação destas alterações no ventrículo direito (VD), no cérebro e nas vesículas extracelulares (EVs) circulantes de ratos com HAP induzida por monocrotalina (MCT). Além disso, em camundongos com HAP induzida por MCT, foram investigados os possíveis efeitos protetores de dois tratamentos: EVs derivadas de células-tronco mesenquimais (MSCs) e superexpressão da superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD). **Métodos:** Na primeira etapa deste trabalho, ratos machos foram divididos em grupo Controle e MCT, e a doença foi induzida pela injeção única intraperitoneal de MCT (60 mg/kg). As avaliações hemodinâmicas e morfométricas e a coleta dos órgãos foi realizada após 21 dias. Após isto, as EVs foram isoladas a partir do sangue destes animais e foram preparadas, juntamente com o VD e o cérebro, para as análises dos parâmetros redox e mitocondriais. Na segunda etapa, camundongos de ambos os sexos foram divididos em grupo Controle, MCT, Controle + EVs e MCT + EVs, a doença foi induzida pela injeção semanal subcutânea de MCT (60 mg/kg) e o tratamento foi feito por injeção intravenosa semanal de MSC-EVs (de medula óssea humana) (3×10^6 partículas/ml) 24 após cada injeção de MCT/veículo, durante 4 semanas. Por fim, na terceira etapa, camundongos de ambos os sexos transgênicos foram divididos em grupo MnSODVE-NE (expressão normal da MnSOD) e MnSODVE-OE (superexpressão da MnSOD), e a doença foi induzida pela injeção semanal subcutânea de MCT (60 mg/kg) durante 4 semanas. Ao final deste período, em ambas as etapas, foi realizada a ecocardiografia e os órgãos foram coletados para posteriores análises morfométricas, histológicas e bioquímicas. **Resultados e discussão:** Na primeira etapa, foi observado um estado redox oxidativo no VD dos animais doentes, bem como o prejuízo na função de moléculas relacionadas à homeostase mitocondrial. Este mesmo perfil foi observado nas EVs circulantes destes animais. Por outro lado, no cérebro, as análises dos parâmetros redox indicaram um ambiente celular pouco oxidativo. Além disso, houve uma preservação da homeostase mitocondrial e do metabolismo energético celular neste tecido. Na segunda e terceira etapas, ambos os tratamentos foram capazes de impedir o desenvolvimento da HAP, uma vez que os animais do grupo MCT + EVs (na segunda etapa) e do grupo MnSODVE-OE (na terceira etapa) não apresentaram

aumento significativo da resistência vascular pulmonar e da hipertrofia do VD, preservando o fluxo pela artéria pulmonar e a função cardíaca direita. Em ambas as etapas, este efeito benéfico foi relacionado com as diferenças na expressão de proteínas envolvidas com o metabolismo energético das células, como a GSK-3 β , a FOXO1 e a CPT1A, avaliadas no tecido pulmonar, que parecem indicar a preservação do metabolismo energético normal celular pelo tratamento com as MSC-EVs e a superexpressão da MnSOD, ao invés da mudança metabólica característica da HAP.

Conclusão: A função cardiopulmonar está severamente afetada pela HAP, com impacto sobre o metabolismo redox e mitocondrial celular no VD. Este estímulo parece alterar o conteúdo das EVs circulantes e estas, por sua vez, atuam como comunicadoras interórgãos para sinalizar o aumento de proteínas envolvidas na manutenção da homeostase redox e mitocondrial. Com base nisto, ambos os tratamentos com MSC-EVs e com superexpressão da MnSOD foram eficazes em proteger a função cardiopulmonar e impedir o desenvolvimento da HAP, através da preservação do metabolismo energético em favor da fosforilação oxidativa.

Palavras-chave: Hipertensão arterial pulmonar; Vesículas extracelulares; Disfunção mitocondrial; Estresse oxidativo; Células-tronco mesenquimais; Superexpressão da MnSOD.

Abstract

Introduction: Being a disease characterized by increased pulmonary vascular resistance and right heart dysfunction, pulmonary arterial hypertension (PAH) is also marked by disturbance of redox and mitochondrial homeostasis. **Objective:** This study aimed to investigate these changes in the right ventricle (RV), brain and circulating extracellular vesicles (EVs) of rats with monocrotaline-induced PAH (MCT). Furthermore, in mice with MCT-induced PAH, the possible protective effects of two treatments were investigated: EVs derived from mesenchymal stem cells (MSCs) and overexpression of mitochondrial superoxide dismutase (MnSOD). **Methods:** In the first stage of this work, male rats were divided between Control and MCT groups, and the disease was induced by a single intraperitoneal injection of MCT (60 mg/kg). Hemodynamic and morphometric evaluations and organ collection were performed after 21 days. After that, the EVs were isolated from the blood of these animals and were prepared, together with the RV and the brain, for the analysis of redox and mitochondrial parameters. In the second stage, mice of both sexes were divided into Control, MCT, Control + EVs and MCT + EVs, the disease was induced by the weekly subcutaneous injection of MCT (60 mg/kg), and the treatment was performed by weekly intravenous injection of MSC-EVs (from human bone marrow) (3×10^6 particles/ml), 24h after each MCT/vehicle injection, for 4 weeks. Finally, in the third stage, transgenic mice of both sexes were divided into groups MnSODVE-NE (normal expression of MnSOD) and MnSODVE-OE (overexpression of MnSOD), and the disease was induced by the weekly subcutaneous injection of MCT (60 mg/kg) for 4 weeks. At the end of this period, in both stages, echocardiography was performed, and the organs were collected for further morphometric, histological, and biochemical analyses. **Results and discussion:** In the first stage, an oxidative redox state was observed in the RV of the sick animals, as well as the impairment in the function of molecules related to mitochondrial homeostasis. This same profile was observed in the circulating EVs of these animals. On the other hand, in the brain, analyzes of redox parameters indicated a low oxidative cellular environment. In addition, there was a preservation of mitochondrial homeostasis and cellular energy metabolism in this tissue. In the second and third stages, both treatments were able to prevent the development of PAH, since the animals in the MCT + EVs group (second stage) and the MnSODVE-OE group (third stage) prevented the increase in pulmonary vascular resistance and hypertrophy of the RV, preserving the flow through the

pulmonary artery and the right heart function. In both stages, this beneficial effect was related to differences in the expression of proteins involved in the energy metabolism of cells such as GSK-3 β , FOXO1 and CPT1A, evaluated in lung tissue, which seem to indicate the preservation of normal cellular energy metabolism performed by treatment with MSC-EVs and MnSOD overexpression, rather than of the characteristic metabolic change in PAH. **Conclusion:** Cardiopulmonary function is severely affected by PAH, with an impact on cellular redox and mitochondrial metabolism in the RV. This stimulus seems to alter the content of circulating EVs and these, in turn, act as interorgan communicators to signal the increase of proteins involved in the maintenance of redox and mitochondrial homeostasis. Based on this, both treatments with MSC-EVs and MnSOD overexpression were effective in protecting cardiopulmonary function and preventing the development of PAH, by preserving energy metabolism in favor of oxidative phosphorylation.

Key words: Pulmonary arterial hypertension; Extracellular vesicles; Mitochondrial dysfunction; Oxidative stress; Mesenchymal stromal cells; MnSOD overexpression.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	18
1.1. Hipertensão pulmonar.....	18
1.2. Hipertensão arterial pulmonar.....	18
1.2.1. Fisiopatologia da HAP.....	20
1.3. Homeostase redox.....	24
1.3.1. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	24
1.3.2. Antioxidantes.....	26
1.3.3. Sinalização redox e estresse oxidativo.....	29
1.4. Homeostase mitocondrial.....	31
1.4.1. Metabolismo energético mitocondrial.....	32
1.4.2. Metabolismo redox mitocondrial.....	34
1.4.3. Regulação da biogênese e atividade mitocondrial.....	38
1.5. Alterações do metabolismo redox e mitocondrial induzidas pela HAP.....	39
1.6. Metabolismo redox e mitocondrial no cérebro.....	43
1.7. Modelos experimentais de HAP.....	44
1.8. Tratamentos e alvos terapêuticos.....	46
1.9. Vesículas extracelulares.....	48
1.9.1. Conceito e caracterização das EVs.....	49
1.9.2. As EVs circulantes do organismo.....	51
1.9.3. Funções das EVs derivadas de células-tronco.....	52
1.9.4. Tratamento com CT-EVs na hipertensão arterial pulmonar.....	53
1.10. Efeito terapêutico da superexpressão da MnSOD.....	54
2. Hipótese e objetivos.....	55
2.1. Hipóteses.....	55
2.2. Objetivo geral.....	55
2.3. Objetivos específicos.....	55
3. Materiais e métodos.....	58
3.1. Experimento I.....	58
3.1.1. Animais.....	58
3.1.2. Protocolo experimental.....	58
3.1.3. Análise hemodinâmica.....	59
3.1.4. Análises morfométricas.....	60
3.1.5. Preparação das amostras e cálculo da concentração proteica.....	60

3.1.6.	Isolamento e caracterização das vesículas extracelulares.....	61
3.1.7.	Concentração total de espécies reativas de oxigênio.....	62
3.1.8.	Atividade da NADPH oxidase.....	62
3.1.9.	Níveis de lipoperoxidação	62
3.1.10.	Atividade das enzimas antioxidantes.....	63
3.1.11.	Antioxidantes não enzimáticos.....	64
3.1.12.	Atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial.....	64
3.1.13.	Atividade da enzima citrato sintase.....	65
3.1.14.	Atividade das enzimas da via da pentose fosfato	65
3.2.	Experimento II.....	66
3.2.1.	Animais.....	66
3.2.2.	Cultura das células mesenquimais e isolamento das MSC-EVs.....	66
3.2.3.	Caracterização das MSC-EVs	67
3.2.4.	Protocolo experimental.....	67
3.2.5.	Análises ecocardiográficas	70
3.2.6.	Análise da pressão sistólica do ventrículo direito	70
3.2.7.	Índice de hipertrofia do ventrículo direito.....	70
3.2.8.	Análise do remodelamento vascular pulmonar	71
3.2.9.	Isolamento e caracterização das EVs derivadas do soro dos animais	71
3.2.10.	Western blot.....	71
3.3.	Experimento III.....	72
3.3.1.	Animais.....	72
3.3.2.	Protocolo experimental.....	73
3.3.3.	Análises ecocardiográficas	75
3.3.4.	Análise da pressão sistólica do ventrículo direito	75
3.3.5.	Índice de hipertrofia do ventrículo direito.....	75
3.3.6.	Análise do remodelamento vascular pulmonar	75
3.3.7.	Western blot.....	75
3.4.	Análises estatísticas	75
4.	Resultados	76
4.1.	Experimento I.....	76
4.2.	Experimento II:.....	79
4.3.	Experimento III:	79
5.	Discussão	79
6.	Considerações finais.....	88

7. Perspectivas.....	88
8. Referências.....	89

Lista de abreviações

- 6PGD - 6-fosfogluconato desidrogenase
- ADP – Adenosina difosfato
- ATP – Adenosina trifosfato
- CAT – Catalase
- CPT1A – Isoforma A da enzima carnitina palmitoiltransferase-1
- CT – Células-tronco
- EVs – Vesículas Extracelulares
- FLOT1 – Flotilina 1
- FOXO1 - Proteína O da família Forkhead
- G6P – Glicose-6-fosfato
- G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase
- GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- GLUT – Transportador de glicose
- GPx – Glutaciona peroxidase
- GSK3 β - Glicogênio sintase quinase 3 β
- HAP – Hipertensão arterial pulmonar
- hBM-MSC – Células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea humana
- HK - Hexoquinase
- HIF-1 α – Fator 1-alfa induzido por hipóxia
- HP – Hipertensão pulmonar
- LDH – Lactato desidrogenase
- LPO – Lipoperoxidação
- MCT – Monocrotalina
- MnSOD – Manganês-superóxido dismutase ou superóxido dismutase mitocondrial
- mPAP – Pressão média da artéria pulmonar
- MSC – Células-tronco mesenquimais
- NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina
- Nox – Família das enzimas NADPH oxidases

NOS – Óxido nítrico sintase
OAG – Oxidação de ácidos graxos
OXPHOS – Fosforilação oxidativa
PAEC – Células endoteliais da artéria pulmonar
PASMC – Células de músculo liso da artéria pulmonar
PDK – Piruvato desidrogenases quinases
PDH – Piruvato desidrogenase
PDVD – Pressão diastólica do ventrículo direito
PGC-1 α – Coativador 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissomo
PPP – Via das pentoses-fosfato
PSVD – Pressão sistólica do ventrículo direito
ROS – Espécies reativas de oxigênio
RVP – Resistência vascular pulmonar
SIRT1 – Sirtuina 1
SOD – Superóxido dismutase
TAPSE - Excursão sistólica do plano anular tricúspide
TCA – Ácidos tricarboxílicos
TG – Glutathionas totais
VD – Ventrículo direito
VE – Ventrículo esquerdo

Lista de figuras

Figura 1. Função e resposta do ventrículo direito (VD) frente ao aumento da resistência vascular pulmonar (RVP).

Figura 2. Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) a partir do oxigênio molecular (O₂) e mecanismos de ação de moléculas antioxidantes.

Figura 3. Principais processos da cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa para geração de energia na forma de ATP.

Figura 4. Comparação entre os principais aspectos do metabolismo energético normal e as alterações metabólicas referentes ao efeito Warburg que ocorre na HAP.

Figura 5. Biogênese e liberação de vesículas extracelulares.

Figura 6. Protocolo experimental do Experimento I.

Figura 7. Protocolo experimental do Experimento II.

Figura 8. Modelo transgênico de superexpressão da MnSOD em células endoteliais.

Figura 9. Protocolo experimental do Experimento III.

Figura 10. Caracterização das vesículas extracelulares isoladas de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea humana.

Figura 11. Efeito do tratamento com MSC-EVs sobre a hemodinâmica da artéria pulmonar de animais com HAP induzida por MCT.

Figura 12. Efeito do tratamento com MSC-EVs sobre o remodelamento vascular pulmonar em animais com HAP induzida por MCT.

Figura 13. Efeito do tratamento com MSC-EVs sobre a função do ventrículo direito em animais com HAP induzida por MCT.

Figura 14. Efeito do tratamento com MSC-EVs sobre a pressão sistólica e a hipertrofia cardíaca direita em animais com HAP induzida por MCT.

Figura 15. Caracterização das vesículas extracelulares isoladas do soro sanguíneo de camundongos dos quatro grupos experimentais.

Figura 16. Efeito do tratamento com MSC-EVs sobre a expressão das proteínas MnSOD, CPT1A, GSK3 β e FOXO1 no tecido pulmonar de animais com HAP induzida por MCT.

Figura 17. Efeito do tratamento com MSC-EVs sobre a expressão da SIRT1 nas EVs circulantes dos camundongos com HAP induzida por MCT.

Figura 18. Efeito da superexpressão da MnSOD sobre a hemodinâmica da artéria pulmonar em animais com HAP induzida por MCT.

Figura 19. Efeito da superexpressão da MnSOD sobre o remodelamento vascular pulmonar em animais com HAP induzida por MCT.

Figura 20. Efeito da superexpressão da MnSOD sobre a função do ventrículo direito em animais com HAP induzida por MCT.

Figura 21. Efeito da superexpressão da MnSOD sobre a pressão sistólica e a hipertrofia cardíaca direita em animais com HAP induzida por MCT.

Figura 22. Panorama geral dos resultados apresentados neste trabalho.

1. Introdução

1.1. Hipertensão pulmonar

A hipertensão pulmonar (HP) é uma condição patológica definida pela pressão média da artéria pulmonar (mPAP) maior que 25 mmHg em repouso [Fazal et al., 2021]. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a HP foi classificada em cinco grupos: Grupo 1 - hipertensão arterial pulmonar (HAP); Grupo 2 – HP devido à doença cardíaca esquerda; Grupo 3 – HP induzida por doenças pulmonares ou hipóxia; Grupo 4 – HP causada por obstruções em artérias pulmonares; Grupo 5 – HP devido a mecanismos multifatoriais ou de causa desconhecida [Fazal et al., 2021]. Estima-se que 1% da população mundial sofre com um tipo de HP, mas a incidência sobe para até 10% se considerados apenas indivíduos com mais de 65 anos [Hoeper et al., 2016].

1.2. Hipertensão arterial pulmonar

A HAP é uma doença que pertence ao grupo 1 da HP e é definida não só pela mPAP ≥ 25 mmHg em repouso, mas também pela pressão de oclusão da artéria pulmonar expiratória final (PAWP) ≥ 15 mmHg e resistência vascular pulmonar (RVP) > 3 unidades Wood [Kovacs et al., 2018]. A HAP tem caráter progressivo e incapacitante, e acomete de 15-50 pessoas a cada milhão de habitantes nos Estados Unidos e na Europa [Levine, 2021], sendo considerada uma doença rara. No restante do mundo, entretanto, a incidência da doença pode ser maior, uma vez que está associada à esquistossomose, doença endêmica em diversas regiões e países em desenvolvimento, e considerada uma das principais causas de HAP em todo o globo [Piscoya Roncal et al., 2019]. No Brasil, a esquistossomose é um grande problema de saúde pública, sendo responsável por até 25% dos casos de HAP [Piscoya Roncal et al., 2019]. Desta forma, pode-se considerar uma maior prevalência da HAP no Brasil em relação aos Estados Unidos e Europa, mas ainda não há um cadastro nacional que permita a investigação epidemiológica da doença no país.

A HAP pode ser causada por diversos fatores, além da esquistossomose, e é classificada conforme a causa associada ao seu desenvolvimento, apesar de todas as formas apresentarem patofisiologia, características clínicas e tratamentos similares

[Levine, 2021; Simonneau et al., 2019]. A classificação da doença está apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Classificação da hipertensão arterial pulmonar.

-
- 1. Hipertensão arterial pulmonar (HAP)**
 - 1.1. HAP idiopática
 - 1.2. HAP hereditária
 - 1.3. HAP induzida por drogas ou toxinas
 - 1.4. HAP associada com:
 - 1.4.1. Doença do tecido conjuntivo
 - 1.4.2. HIV
 - 1.4.3. Hipertensão portal
 - 1.4.4. Doenças cardíacas congênitas
 - 1.4.5. Esquistossomose
 - 1.5. HAP de resposta de longo prazo aos bloqueadores dos canais de cálcio
 - 1.6. HAP com características evidentes de PVOD/PCH
 - 1.7. HAP persistente da síndrome do recém-nascido
-

Classificação de acordo com a Organização Mundial da Saúde. PVOD: doença veno-oclusiva pulmonar; PCH: hemangiomatose capilar pulmonar.

A incidência de HAP na população também varia conforme a idade, gênero e etnia. De acordo com o mais recente registro REVEAL (Registro para avaliar o manejo de curto e de longo prazo da HAP), feito nos Estados Unidos, a idade média dos indivíduos com esta doença é de 53 anos (\pm 14 anos) e, além disso, há uma prevalência maior em caucasianos e em pessoas de sexo biológico feminino (4,8:1 em relação a pessoas de sexo biológico masculino) [Prins and Thenappan, 2016]. Essa grande diferença de prevalência em relação ao gênero gera um paradoxo que ainda é alvo de discussão entre pesquisadores em todo o mundo. O motivo disso é que, embora haja um risco maior de desenvolvimento da doença em indivíduos de sexo biológico feminino, a sobrevivência destas pessoas após o diagnóstico também é maior [Morris et al., 2021], e acredita-se que isto é devido a uma melhor função cardíaca observada [Keen et al., 2021]. Essas diferenças, entretanto, diminuem significativamente após os 45 anos de idade, período em que, geralmente, inicia-se a menopausa e a produção de estrogênio é

diminuída, sugerindo que este hormônio está envolvido tanto no desenvolvimento da HAP quanto na cardioproteção que confere maior taxa de sobrevivência para pessoas de sexo biológico feminino em relação às de sexo biológico masculino [Keen et al., 2021; Morris et al., 2021].

1.2.1. Fisiopatologia da HAP

A fisiopatologia da HAP é complexa, uma vez que envolve diversos mecanismos que afetam diferentes tipos celulares da vasculatura pulmonar. Estas alterações na vasculatura pulmonar são denominadas como remodelamento vascular pulmonar e são responsáveis pelo aumento da RVP e da mPAP, que, por sua vez, levam ao aumento da pós-carga imposta ao ventrículo direito (VD), promovendo hipertrofia e disfunção do VD e podendo levar à insuficiência cardíaca [Fazal et al., 2021; Morris et al., 2021].

O remodelamento vascular pulmonar é caracterizado pelo espessamento das camadas média e adventícia do músculo liso vascular e da muscularização distal das arteríolas pré-capilares. Além disso, há o aparecimento de uma camada neointima, que causa oclusão da luz do vaso, o aparecimento de lesões plexiformes e um progressivo espessamento das paredes da artéria pulmonar [Fazal et al., 2021]. Pesquisadores atribuem este espessamento ao comportamento das células do músculo liso da artéria pulmonar (PASMCs), que seria semelhante ao comportamento de células cancerosas, uma vez que há a proliferação descontrolada destas células e resistência à apoptose [Grobs et al., 2021]. A mudança para este estado hiperproliferativo das células da vasculatura pulmonar está associada à superexpressão de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e de fatores de crescimento, já observada em indivíduos com a doença, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), a endotelina (ET), a serotonina (5-HT), o fator de crescimento transformante beta (TGF- β), a angiopoietina 1 (Ang-1), o fator de crescimento epidermal (EGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) [Fazal et al., 2021; Grobs et al., 2021].

Além disso, outro aspecto muito importante envolvido no processo de remodelamento vascular pulmonar é a disfunção endotelial. As células endoteliais são consideradas as principais reguladoras da função e da homeostase vascular e estão localizadas entre o lúmen e a parede dos vasos sanguíneos [Park and Park, 2015; Shimoda

and Laurie, 2013]. Sendo assim, estas células são responsáveis por manter o equilíbrio entre vasoconstritores, como a endotelina 1 (ET-1), a angiotensina II (AT-II), o tromboxano A₂ (TXA₂) e a prostaglandina H₂ (PGH₂), e vasodilatadores, como o óxido nítrico (NO), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e a prostaciclina (PGI₂) [Fazal et al., 2021; Park and Park, 2015]. Durante o desenvolvimento da HAP, este equilíbrio é prejudicado pela disfunção endotelial, que se reflete na redução da expressão de vasodilatadores e aumento da expressão de vasoconstritores. Dessa forma, tanto a disfunção das PSMCs quanto a disfunção das células endoteliais contribuem para o estado de vasoconstrição crônica característico da HAP, levando à diminuição do lúmen vascular e, conseqüentemente, ao aumento da resistência vascular pulmonar [Fazal et al., 2021; Levine, 2021].

1.2.1.1. Disfunção cardíaca como consequência do remodelamento vascular pulmonar

Ainda que o processo patológico da HAP seja iniciado pela disfunção das células musculares lisas e endoteliais pulmonares, a principal causa de morte dos pacientes se dá em razão da insuficiência cardíaca iniciada no VD [Prins and Thenappan, 2016]. De fato, a insuficiência cardíaca direita é, na maioria das vezes, uma consequência do aumento da pós-carga imposta pela circulação pulmonar ao VD, uma vez que, para ejetar o sangue venoso a ser oxigenado nos pulmões, esta câmara cardíaca precisa superar a resistência média dos vasos pulmonares [El Hajj et al., 2020].

Na HAP, a elevação da pós-carga em decorrência do progressivo aumento da RVP faz com que o VD precise aumentar sua força de ejeção. Para isso, há um processo de remodelamento do músculo cardíaco direito, caracterizado pela hipertrofia das fibras [Prins and Thenappan, 2016]. Inicialmente, este processo é considerado adaptativo, ou homeométrico, uma vez que ocorre aumento da espessura da parede ventricular de forma compensatória (caracterizando uma hipertrofia concêntrica, com pouca alteração do diâmetro do ventrículo), permitindo o aumento da contratilidade, mantendo o débito cardíaco e minimizando o estresse de parede ventricular [Cassady and Ramani, 2020]. Esta resposta de aumento da contratilidade para se adequar ao aumento da pós-carga é chamada de “acoplamento” entre o VD e a circulação pulmonar, ou, ainda, unidade de circulação cardíaca-pulmonar direita [Naeije et al., 2018]. Neste contexto, o acoplamento ventrículo-arterial ocorre quando a elastância sistólica final, ou seja, a relação da variação

da pressão sobre a variação do volume ao final da sístole, tanto do VD (Ees) quanto da artéria pulmonar (Ea), são iguais, fornecendo uma mecânica eficiente de ejeção de sangue do ventrículo para a circulação pulmonar e preservando a função sistólica [El Hajj et al., 2020] (Fig. 1).

No momento em que o músculo não tem mais capacidade de aumentar sua contratilidade para acompanhar o constante aumento da pós-carga, o VD começa a dilatar para acomodar um maior volume sanguíneo residual, desenvolvendo uma hipertrofia excêntrica em resposta ao remodelamento mal-adaptativo, ou heterométrico, que se inicia [Sanz et al., 2019]. A dilatação do VD é acompanhada pela diminuição do acoplamento ventrículo-arterial e da razão Ees/Ea entre as elastâncias do VD e da artéria pulmonar, uma vez que a Ea fica cada vez maior (contínuo aumento da RVP) e a Ees diminui (maior volume sistólico final sem aumento da pressão ventricular na mesma proporção) [El Hajj et al., 2020]. Dessa forma, a função sistólica é comprometida, reduzindo a fração de ejeção e o débito cardíaco, levando à insuficiência do VD, disfunção cardíaca e, posteriormente, à morte do paciente [Prins and Thenappan, 2016] (Fig. 1).

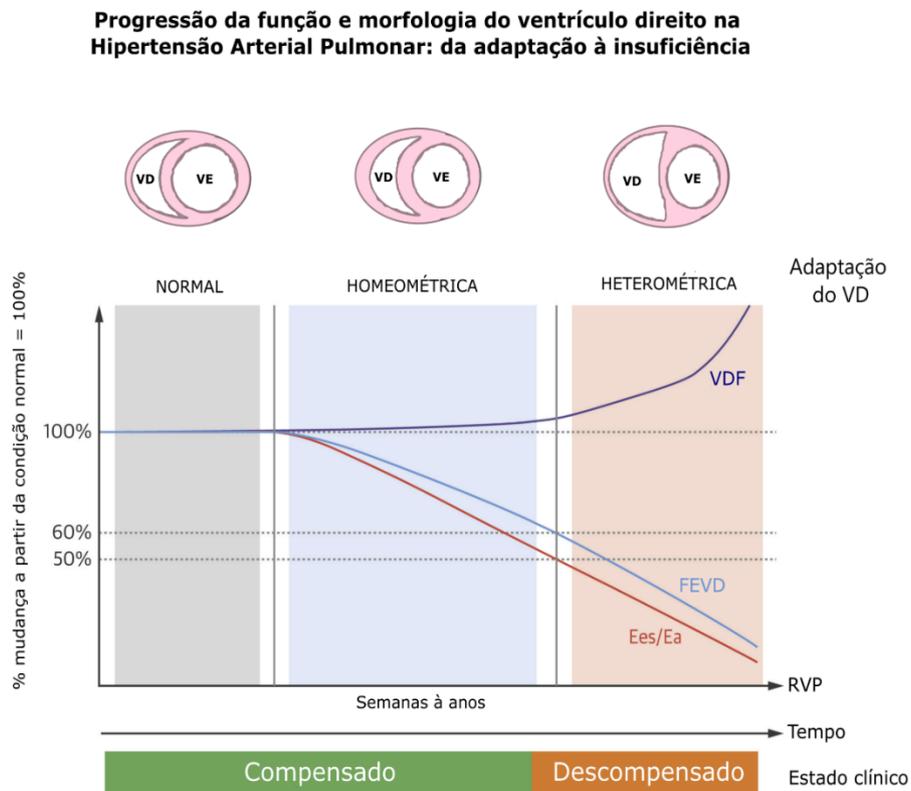


Figura 1. Função e resposta do ventrículo direito (VD) frente ao aumento da resistência vascular pulmonar (RVP). Traduzido e adaptado de Sanz, J. et al. J Am Coll Cardiol.

2019;73(12):1463-1482. Em resposta ao progressivo aumento da RVP que ocorre na hipertensão arterial pulmonar (HAP), há hipertrofia concêntrica do VD para aumentar a contratilidade durante a fase homeométrica de adaptação, na tentativa de preservar o acoplamento ventrículo-arterial e a razão entre a elastância sistólica final do VD e a elastância da artéria pulmonar (Ees/Ea), mantendo o estado compensado da função cardíaca direita. Ao longo do tempo, entretanto, essa resposta vai se tornando insuficiente e a Ees/Ea diminui na mesma proporção da diminuição da fração de ejeção do VD (FEVD). A diminuição destes parâmetros abaixo de 50% e 60%, respectivamente, faz com que o coração direito inicie a fase de adaptação heterométrica, com hipertrofia excêntrica que promove a dilatação do VD e o achatamento do septo interventricular em resposta ao progressivo aumento do volume diastólico final (VDF), representando o estado descompensado da função cardíaca direita. VE = ventrículo esquerdo.

A transição do remodelamento adaptativo para mal-adaptativo do VD não depende apenas da resposta dos cardiomiócitos às alterações de volume e pressão cardíaca e pulmonar. Diversos mecanismos estão envolvidos neste processo, como a apoptose, a vascularização inadequada do tecido, o remodelamento metabólico, a inflamação e fibrose, a ativação neuro-hormonal e o estresse oxidativo [Zelt et al., 2019].

1.2.1.2. Ação da HAP para além da região cardiopulmonar

Os efeitos prejudiciais da HAP são bem conhecidos e ainda muito estudados no tecido pulmonar e cardíaco, principalmente, mas, também, nos tecidos muscular esquelético e hepático. Por ser considerada uma doença sistêmica e apresentar disfunção endotelial proeminente, considera-se que seus efeitos deletérios também podem se estender para os outros órgãos do corpo, mesmo em menor escala [Nickel et al., 2020].

A disfunção renal é um desfecho comum em diversas doenças cardiovasculares, mas é, ainda, pouco estudada na HAP, doença do grupo 1 de classificações da HP, embora tenha uma quantidade maior de dados no que se refere aos grupos 2 e 5. Apesar disso, a prevalência de disfunção renal em pacientes com HAP é alta e varia de 4 a 36% dos pacientes. Alguns autores sugerem que esta alteração está relacionada com as mudanças hemodinâmicas no VD causadas pela doença, que elevam a pressão atrial direita, contribuindo para o desenvolvimento e progressão da disfunção renal [Nickel et al., 2017].

Outro órgão com íntima relação com a circulação pulmonar e cardíaca é o cérebro, que, além disso, pode ser muito sensível a mudanças na concentração de oxigênio sanguínea [Nickel et al., 2020]. De fato, alterações no fluxo sanguíneo cerebral já foram reportadas em estudos clínicos com pacientes com HAP, onde observou-se que alguns fatores como disfunção da sensibilidade barorreflexa, aumento da atividade simpática e hipocapnia estavam relacionados com a diminuição da reatividade ao CO₂ e da oxigenação cerebral [Malenfant et al., 2017].

1.3. Homeostase redox

Reações de oxidação-redução (redox) são processos químicos fundamentais para a regulação e o metabolismo das células, principalmente durante a respiração e a sinalização celular. Sendo assim, a constante produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), moléculas consideradas pró-oxidantes, faz parte do funcionamento fisiológico do organismo. Em condições normais, a geração de ROS e RNS é equilibrada pela ação de compostos antioxidantes, que impedem o seu aumento acima do nível fisiológico necessário para a regulação das diversas funções celulares, de forma que mantenha a chamada homeostase redox. Entretanto, o desequilíbrio deste sistema que favorece o acúmulo de oxidantes em detrimento dos antioxidantes, é chamado de estresse oxidativo [Liang et al., 2021; Łuczaj et al., 2017].

1.3.1. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

As ROS e as RNS incluem tanto os radicais livres, constituídos de uma molécula de oxigênio ou nitrogênio instável com elétrons desemparelhados, como as espécies não-radicaais, consideradas mais estáveis. A relação das espécies mais relevantes está listada na tabela 2.

Tabela 2. Identificação e caracterização das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

Nome	Fórmula	Características
<i>Espécies reativas de oxigênio</i>		
Ânion superóxido	$\cdot\text{O}_2^-$	Altamente oxidante e potente na indução de dano celular
Radical hidroxil	$\cdot\text{OH}$	Altamente reativo; gerado a partir da reação de Fenton ou Haber-Weiss, ou radiação ionizante
Oxigênio singlet	$^1\text{O}_2$	Molécula de oxigênio excitada; pode causar mutação no DNA
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	Oxidante fraco, porém com alta capacidade de causar dano oxidativo por gerar $\cdot\text{OH}$
<i>Espécies reativas de nitrogênio</i>		
Peroxinitrito	ONOO^-	Formado a partir da reação de $\cdot\text{O}_2^-$ com $\text{NO}\cdot$; alto potencial oxidante
Ânion nitrito	NO_2^-	Pode gerar nitrosaminas, compostos tóxicos que favorecem a ocorrência de diversas doenças
Óxido nítrico	$\text{NO}\cdot$	Baixa reatividade com moléculas biológicas, mas alta com outros radicais livres
Óxido nitroso	N_2O	Conhecido como gás hilariante, um dos gases que mais contribui para o efeito estufa

[Forman, 2016; Sies, 2015; Sies and Jones, 2020]

A geração de ROS nas células possui diversas fontes, sendo a principal delas a utilização do oxigênio (O_2) pela cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias, processo que ocorre normalmente em organismos aeróbios [Griendling et al., 2016]. Há diversas enzimas e famílias de enzimas que contribuem com a geração intracelular de ROS, como as enzimas NADPH oxidases (fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina oxidases, que aqui será representada pela sigla Nox), a xantina oxidase, as ciclo-oxigenases, as enzimas do citocromo P450, as lipo-oxigenases e a óxido nítrico sintase (NOS desacoplada) [Senoner and Dichtl, 2019]. Além disso, reações químicas que envolvem a oxidação de íons de ferro, com possível envolvimento de outros metais, como o cobre, cromo e cobalto, também podem contribuir para o aumento da produção de ROS (processo conhecido como reação de Fenton) [Griendling et al., 2016].

1.3.2. Antioxidantes

Para manter a homeostase redox, as células possuem sistemas de defesa para impedir um aumento incomum nos níveis de ROS e RSN. Esta defesa é realizada por compostos enzimáticos e não-enzimáticos [Senoner and Dichtl, 2019], alguns dos quais estão relacionados na tabela abaixo (tabela 3).

Tabela 3. Identificação e caracterização de moléculas pertencentes ao sistema de defesa antioxidante.

Nome	Características
<i>Compostos antioxidantes enzimáticos</i>	
Superóxido dismutase (SOD)	Catalisa a dismutação do ânion superóxido, formando H_2O_2
Catalase (CAT)	Está presente nos peroxissomos e catalisa a redução direta do H_2O_2
Glutationa peroxidase (GPx)	Catalisa a redução indireta do H_2O_2 e peróxidos orgânicos, utilizando a GSH como substrato
Peroxirredoxinas (Prx)	São abundantes nos eritrócitos e agem da redução de H_2O_2 e $ONOO^-$
Tiorredoxinas (Trx)	Agem reduzindo resíduos de cisteína oxidados e quebrando pontes de dissulfeto
<i>Compostos antioxidantes não-enzimáticos</i>	
Glutationa (reduzida – GSH/oxidada - GSSG)	Muito importante, a razão GSH/GSSG pode ser usada para estimar o estado redox biológico
Vitamina E/tocoferol	Proveniente do consumo de óleos vegetais, grãos etc. É inibidor da peroxidação lipídica
Vitamina A/retinol	Proveniente do consumo de leite, ovos, cenoura etc. Reage com espécies reativas.
Vitamina C/ácido ascórbico	Proveniente do consumo de laranja, limão etc. Tem ação redutora e ajuda a regenerar a vitamina E a partir do radical tocoferil
Polifenóis	Compostos bioativos com papel importante na prevenção de doenças (ex: flavonoides e resveratrol)

[Ferguson and Bridge, 2019; He et al., 2017; Jones, 2006; Sies, 1997; Stone et al., 2019; Wang et al., 2018]

Embora todos estes compostos antioxidantes tenham funções importantes na sinalização intracelular e na manutenção do equilíbrio redox, alguns destes foram analisados neste trabalho e serão abordados de forma mais aprofundada a seguir.

A primeira linha de defesa antioxidante endógena das células é através da ação das enzimas SOD, CAT e GPx, que rapidamente reduzem o $\bullet\text{O}_2^-$ e o H_2O_2 e impedem que estas moléculas se acumulem e causem dano celular [He et al., 2017]. A SOD é expressa na maioria dos organismos aeróbios e pode ser classificada de acordo com o seu local de atuação na célula. Desta forma, dentro da família da SOD existem as isoformas CuZnSOD (SOD1) de origem citosólica, MnSOD (SOD2) de origem mitocondrial e ECSOD (SOD3) de origem extracelular. Independente da sua origem subcelular e de seu íon cofator, a SOD é a única enzima conhecida capaz de reduzir especificamente o $\bullet\text{O}_2^-$, através da sua atividade de dismutação que catalisa a reação com este radical livre, formando oxigênio e H_2O_2 (Fig. 2). Dessa forma, a importância desta enzima não se dá apenas pela sua ação sobre o ânion superóxido, mas, também, sobre outras espécies reativas derivadas dele, como o H_2O_2 , o ONOO^- e outros radicais livres secundários [Wang et al., 2018].

Mesmo que o H_2O_2 seja mais estável, o fato desta espécie ser precursora de outras moléculas altamente reativas lhe confere um alto potencial oxidante e faz com que seja necessária a ação de enzimas que a neutralizem [Griendling et al., 2016]. As enzimas CAT e GPx são as responsáveis por catalisar a decomposição do H_2O_2 , mas suas ações ocorrem de formas distintas. A CAT age diretamente sobre a molécula de H_2O_2 , decompondo-a em oxigênio e água (Fig. 2), sendo considerada crucial para a resposta celular contra esta ROS [Nandi et al., 2019]. Entretanto, a ação da enzima é mais eficiente quando em alta concentração de H_2O_2 , sendo menos específica quando há baixa concentração desta espécie, o que induz a ação de outras peroxidases [Sepasi Tehrani and Moosavi-Movahedi, 2018]. Já a ação da GPx ocorre de forma indireta e está ligada com a ação da GSH, pois esta enzima reduz os níveis de H_2O_2 através da utilização de GSH como substrato (Fig. 2), que passa da forma reduzida para a forma oxidada (GSSG). Este mecanismo de ação da GPx não se limita apenas ao H_2O_2 , sendo importante catalisadora das reações de redução de peróxidos orgânicos [Łuczaj et al., 2017].

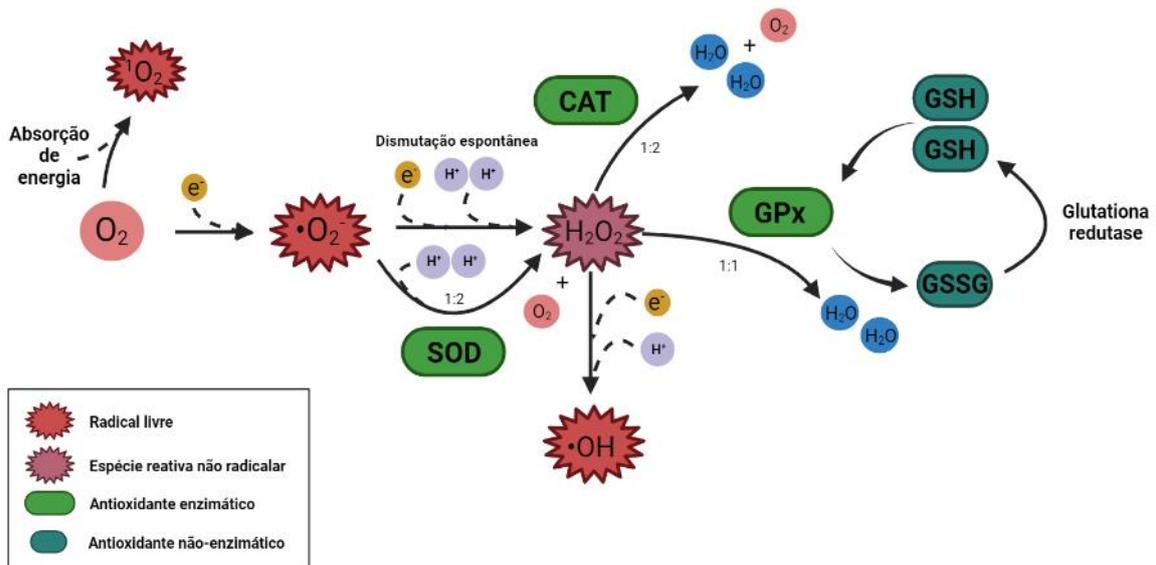


Figura 2. Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) a partir do oxigênio molecular (O_2) e mecanismos de ação de moléculas antioxidantes. Durante a utilização do O_2 no processo de respiração celular, esta molécula pode ser eletronicamente excitada, formando o oxigênio singlet (1O_2), e sofrer uma redução incompleta, aceitando apenas um elétron (e^-), formando o radical livre ânion superóxido ($\bullet O_2^-$). Esta espécie é instável e sofre dismutação espontânea em meio aquoso, formando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A reação de dismutação do $\bullet O_2^-$ também pode ser catalisada pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), único antioxidante capaz de reduzir este radical livre, a qual reduz duas moléculas de $\bullet O_2^-$ a cada reação (1:2). O H_2O_2 por si só é uma espécie estável, mas é importante que seja reduzida, devido a sua capacidade de oxidar íons de ferro e formar o radical hidroxil ($\bullet OH$), um potente radical livre (reações de Fenton e de Haber-Weiss). A catalase (CAT) age diretamente sobre o H_2O_2 , reduzindo duas moléculas a cada reação (1:2), formando água e O_2 . A glutaciona peroxidase (GPx) reduz o H_2O_2 indiretamente (1:1), utilizando duas moléculas de glutaciona reduzida (GSH) como substrato e formando glutaciona oxidada (GSSG) no processo. Posteriormente, a enzima glutaciona redutase converte a GSSG em GSH novamente.

Criada em BioRender.com.

Entre as defesas antioxidantes não-enzimáticas, o sistema das glutacionas é o que mais se destaca. A GSH é encontrada em abundância em organismos eucarióticos e sua função nas células é muito importante e não se limita apenas a sua ação contra espécies reativas, mas também participa de processos como a detoxificação de compostos xenobióticos, a modulação da proliferação celular e a manutenção do estado redox [Ferguson and Bridge, 2019]. No contexto do desenvolvimento de um processo patológico, a manutenção do estado redox é essencial, pois este reflete a tendência das

moléculas celulares de estarem recebendo mais ou doando mais elétrons, indicando um estado mais oxidado ou mais reduzido, respectivamente. Sendo assim, uma das formas de determinar o estado redox biológico de uma célula ou tecido é através da mensuração dos níveis de GSH e GSSG. Em um estado redox mais oxidado, a razão GSH/GSSG diminui, indicando diminuição dos níveis de GSH e aumento dos níveis de GSSG, caracterizando uma situação de estresse oxidativo. Por sua vez, o equilíbrio entre os níveis destas duas formas da glutathiona indica um estado fisiológico normal [Griendling et al., 2016; Senoner and Dichtl, 2019].

Uma característica importante da GSH é que ela é uma molécula tiol, ou seja, possui um grupo funcional sulfidril (-SH) ligado a um átomo de carbono em sua composição química [Ferguson and Bridge, 2019]. As propriedades químicas do grupo tiol conferem à GSH o papel de manter o estado redox reduzido, pois reagem com moléculas eletrofílicas, como algumas ROS e RNS. Sendo assim, os níveis de -SH também são um importante indicador de estado redox e da atividade antioxidante celular. Apesar de ser a mais abundante e essencial, a GSH não é a única molécula tiol presente nas células e compostos como a tioredoxina e o aminoácido cisteína, que compõem diversas proteínas, também são tiois. Além disso, diversas drogas utilizadas na clínica contêm -SH na sua composição química, que lhe confere a propriedade antioxidante, podendo agir tanto na remoção de ROS e RNS, como na quelatação de íons metálicos, como cobre, chumbo e mercúrio, que podem bloquear a atividade de enzimas e promover oxidação. Exemplos destas drogas que contêm tiol são a N-acetilcisteína (NAC), utilizada para tratar intoxicação por paracetamol, pois, entre outras funções, mantém os níveis de GSH no fígado em resposta ao processo oxidativo agudo causado por este composto, e o captopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) [Pfaff et al., 2019].

1.3.3. Sinalização redox e estresse oxidativo

Antigamente, pesquisadores consideravam que a produção de ROS era uma infeliz consequência de viver dependendo de oxigênio, mas hoje em dia já se sabe que algumas destas moléculas são fundamentais para uma adequada sinalização intracelular, defesa contra micro-organismos e vias de crescimento e morte celular. O H_2O_2 , por exemplo, em níveis intracelulares fisiológicos é um importante sinalizador das respostas de proliferação, diferenciação e migração celulares, e de angiogênese. Além disso, um

pequeno aumento nos níveis desta espécie reativa ainda é considerado relevante, pois induz vias de adaptação de resposta ao estresse causado naturalmente por alguns processos fisiológicos, como o envelhecimento [Sies and Jones, 2020].

Entretanto, o problema de haver um acúmulo de ROS e RNS no organismo é que estas moléculas acabam causando desequilíbrio redox por favorecer um estado redox mais oxidado, perturbando a homeostase celular [Schieber and Chandel, 2014; Sies and Jones, 2020]. Utilizando o exemplo anterior do H_2O_2 , em caso de aumento da concentração intracelular para níveis supra-fisiológicos, esta espécie acaba induzindo respostas patológicas, como a ativação de vias inflamatórias, indução de proliferação descontrolada de um tipo celular, fibrogênese e morte celular. Estas alterações patológicas (agora considerando não apenas o H_2O_2 , mas todas as outras ROS e RNS) são desencadeadas através do dano oxidativo causado por estas espécies sobre biomoléculas, como lipídeos, proteínas e DNA/RNA, prejudicando suas funções [Sies and Jones, 2020].

Algumas espécies reativas atuam diretamente sobre lipídeos de membrana, causando oxidação e resultando na geração de radicais livres, como lipoperóxidos e hidroperóxidos. Em condições fisiológicas, este processo ocorre em baixas concentrações e os produtos gerados são importantes em vias de inflamação e autofagia [Gaschler and Stockwell, 2017; Lee et al., 2012b]. Entretanto, quando em estresse oxidativo, o aumento descontrolado da concentração de ROS e RNS inicia um processo conhecido como peroxidação lipídica (ou lipoperoxidação – LPO), que pode acabar alterando a composição, estrutura e dinâmica das membranas celulares, além de favorecer a geração de compostos oxidantes secundários capazes de modificar proteínas e DNA [Ayala et al., 2014; Gaschler and Stockwell, 2017].

Outro aspecto importante da sinalização redox é a alteração de proteínas, que, por sua vez, têm sua função modificada, podendo ocasionar mudanças de atividade enzimática, transcrição de genes e instabilidade genômica [Schieber and Chandel, 2014]. No contexto de sinalização celular, a oxidação de proteínas não é necessariamente prejudicial, pois tem papel muito importante na regulação da função celular. Diversas proteínas, incluindo proteínas de transporte, receptores celulares ou de membrana e fatores de transcrição, têm sua estrutura química formada por aminoácidos altamente sensíveis à oxidação, como cisteína, metionina, serina, prolina, histidina e treonina [Sies et al., 2017]. Estes aminoácidos-alvo compõem a estrutura de moléculas sinalizadoras importantes, como: proteínas de choque térmico; sistema Nrf2-KEAP1 (fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2-Proteína 1 associada a ECH tipo Kelch), fator de

transcrição de proteínas antioxidantes; NF- κ B (fator nuclear kappa B), fator de transcrição de genes ligados à resposta inflamatória; FOXO1 (proteína O da família Forkhead), fator de transcrição que contribui para a manutenção da homeostase celular; HIF (fator induzível por hipóxia), maior regulador da resposta celular à diminuição dos níveis de oxigênio [Sies and Jones, 2020]. Sendo assim, a modificação oxidativa de aminoácidos em proteínas está implicada em diversos processos biológicos, como ativação do sistema antioxidante, resposta imunológica e até no desenvolvimento embrionário. Por outro lado, a oxidação de proteínas de forma descontrolada, como ocorre no estresse oxidativo, pode causar inibição ou uma ativação exagerada de proteínas e vias de sinalização importantes para o funcionamento celular adequado [Sies et al., 2017].

A sinalização redox das mitocôndrias também possui papel biológico fundamental para o correto desenvolvimento da atividade celular, estando envolvida na resposta à hipóxia, ativação de células do sistema imune, resposta celular ao exercício físico e metabolismo da insulina [Ježek et al., 2020].

1.4. Homeostase mitocondrial

As mitocôndrias são organelas que desempenham diversas funções dentro das células, sendo a principal delas a respiração celular, responsável pela geração de energia na forma de ATP (adenosina trifosfato). Além disso, as mitocôndrias são muito importantes em outras funções fisiológicas, como os processos de morte celular e apoptose, autofagia, metabolismo, fluxo de cálcio e imunidade inata [Song et al., 2021]. Estas organelas se comunicam de forma recíproca com o núcleo da célula, uma vez que alterações de expressão gênica a partir do núcleo promovem biogênese e/ou aumento da atividade respiratória mitocondrial (regulação anterógrada) e o metabolismo mitocondrial promove e participa da regulação da expressão de diversos genes envolvidos em diferentes funções celulares (regulação retrógrada) [Martínez-Reyes and Chandel, 2020]. A maioria das células eucarióticas contém um alto número de mitocôndrias no seu citoplasma, sendo que esta quantidade é ainda maior em tipos celulares com alta demanda energética, como é o caso das células cardíacas e cerebrais [Rich and Maréchal, 2010].

1.4.1. Metabolismo energético mitocondrial

Em condição fisiológica normal, as mitocôndrias produzem energia através do processo de fosforilação oxidativa, a etapa final do mecanismo de geração de ATP dentro das células. Inicialmente, há a oxidação de moléculas utilizadas como substrato para a respiração celular, como os ácidos graxos e a glicose. Através de um processo chamado de glicólise, uma molécula de glicose que entra nas células através de um transportador de glicose (GLUT) é convertida em glicose-6-fosfato (G6P) pela enzima hexoquinase (HK) no citoplasma. A partir disso, a G6P é utilizada tanto na via das pentoses fosfato (PPP) quanto na via glicolítica. Na via glicolítica, após uma série de reações, são produzidas duas moléculas de piruvato, dois ATP e dois NADH^+ [García-Niño et al., 2021]. As moléculas de piruvato são, então, transportadas para a matriz mitocondrial e transformadas em acetil-CoA (acetil coenzima A), reação catalisada pela enzima piruvato desidrogenase (PDH), formando mais dois NADH^+ . Dentro das mitocôndrias, a oxidação dos ácidos graxos (também conhecida como β -oxidação, ou OAG) também contribui bastante para a obtenção de acetil-CoA. Nesta via metabólica, os ácidos graxos livres são transportados para dentro da célula e transformados em acil-carnitina, que, por sua vez, é transportada para dentro da mitocôndria através da enzima carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1A). Na mitocôndria, a acil-carnitina é transformada em acil-CoA pela enzima carnitina palmitoiltransferase 2 (CPT2A), que será convertida em acetil-CoA durante a β -oxidação [Alruwaili et al., 2019]. Sendo assim, a acetil-CoA obtida através da glicólise e da β -oxidação é oxidada através de uma série de reações enzimáticas conhecida como ciclo de Krebs ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), com a finalidade de produzir mais NADH^+ , além de GTP (trifosfato de guanosina) e FADH_2 (dinucleótido de flavina e adenina) [Martínez-Reyes and Chandel, 2020]. Uma das enzimas envolvidas neste processo é a citrato sintase (CS), que catalisa a primeira reação do ciclo do TCA, correspondente à conversão de oxaloacetato e acetil-CoA em citrato. Dessa forma, a CS é considerada uma enzima limitante do ciclo do TCA, regulando, então, a produção energética das mitocôndrias [Sajani et al., 2017]. As moléculas de NADH^+ e FADH_2 geradas nos processos descritos acima são utilizadas, então, para iniciar o transporte de elétrons através de uma série de complexos que compõem a cadeia transportadora de elétrons (CTE) ou cadeia respiratória mitocondrial, presentes na membrana interna mitocondrial [Rich and Maréchal, 2010].

O complexo I, também chamado de NADH-coenzima Q oxidoreductase, é o primeiro complexo proteico desta cadeia e tem como função a redução da coenzima Q (também chamada de ubiquinona, é uma quinona que está presente na membrana mitocondrial) através de uma reação que utiliza dois elétrons doados por um NADH^+ , reoxidando-o em NAD^+ , liberando quatro prótons (H^+) para o espaço intermembranas. Já o complexo II, também chamado de succinato-coenzima Q oxidoreductase, é um segundo ponto de entrada para a CTE, uma vez que realiza a redução da coenzima Q através de uma reação que utiliza dois elétrons doados por um FADH_2 (proveniente do ciclo do TCA), reoxidando-o em FAD , sem liberação de prótons. Os elétrons transferidos nos complexos I e II são, então, transportados para o complexo III com o auxílio da coenzima Q. O complexo III, também chamado de citocromo oxidase, oxida a coenzima Q proveniente dos dois complexos anteriores, liberando quatro prótons e transferindo seus elétrons para o citocromo c, uma pequena proteína presente na membrana interna mitocondrial, que fica na forma reduzida. Esta proteína carrega e transfere os elétrons para o complexo IV, também chamado de citocromo c oxidase, onde é oxidada, transferindo os elétrons transportados para uma molécula de O_2 , o aceptor final dos elétrons, liberando mais quatro prótons e produzindo água. Ao final da CTE há a enzima ATP sintase, que é considerada o complexo V da cadeia, sendo a última enzima do processo de fosforilação oxidativa. Os prótons liberados pelos complexos I, III e IV para o espaço intermembranas se acumulam e geram um gradiente de concentração entre este espaço e a matriz mitocondrial. Com isso, através de um canal presente na ATP sintase, estes prótons são transportados do espaço intermembranas para a matriz e a enzima utiliza esta energia para fosforilar o ADP (adenosina difosfato) produzindo, assim, o ATP [Choudhury, 2021; Lv et al.; Rich and Maréchal, 2010]. Estes processos foram ilustrados de forma resumida na figura 3.

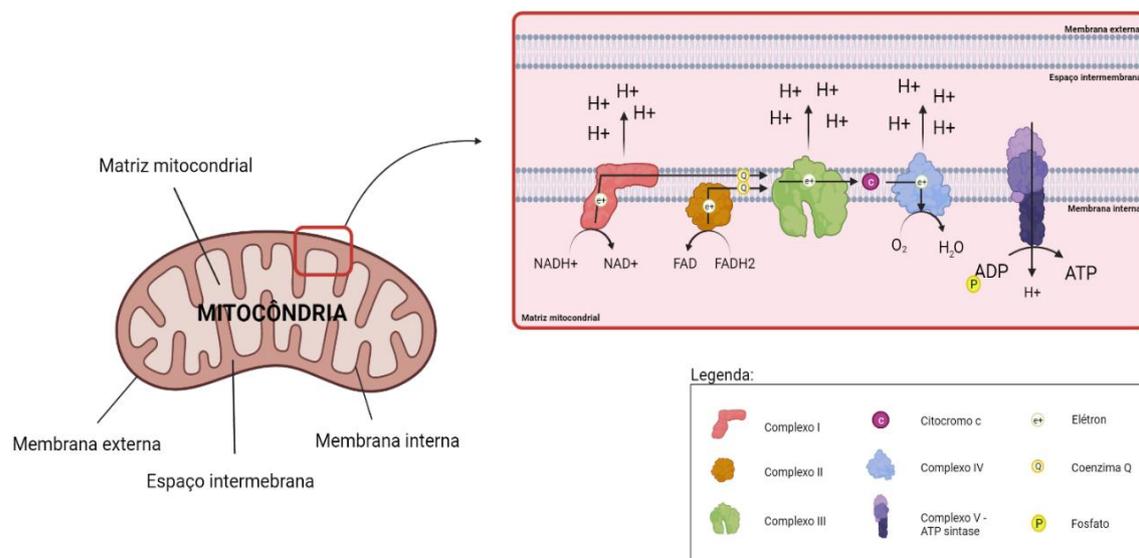


Figura 3. Principais processos da cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa para geração de energia na forma de ATP. Localizado na membrana interna da mitocôndria, a cadeia de transporte de elétrons depende da geração de NADH^+ e FADH_2 gerados no ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Estas duas moléculas servem como cofatores para o complexo I e o complexo II, respectivamente, que as reduzem em NAD^+ e FAD , promovendo a liberação de um elétron, que será transportado, com auxílio da coenzima Q, para o complexo III. O citocromo c é usado para transportar o elétron entre os complexos III e IV. A atividade nos complexos I, III e IV leva à liberação de prótons para o espaço entre as membranas interna e externa, gerando um gradiente de concentração que favorece a atividade da enzima ATP sintase (complexo V). Estes prótons são transportados do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial através da ATP sintase, a favor do seu gradiente de concentração, gerando energia. Esta energia é, então, utilizada pela enzima para fosforilar a molécula de ADP na matriz mitocondrial, gerando ATP. Criada em BioRender.com.

1.4.2. Metabolismo redox mitocondrial

Os processos metabólicos descritos no item anterior são fundamentais para o suprimento energético celular; entretanto, têm como consequência a geração de ROS [Choudhury, 2021]. De fato, a CTE é considerada a principal fonte de ROS dentro das células, que, em níveis normais, são importantes para a homeostase redox e regulação de diversas vias de sinalização celular. No entanto, em condições patológicas onde há desestabilização da dinâmica mitocondrial, há um escape maior dos elétrons transportados na cadeia respiratória, que interagem com o O_2 presente nas células, formando ânion superóxido [Choudhury, 2021; Rich and Maréchal, 2010]. Na organela,

este radical livre é convertido em H_2O_2 pela CuZnSOD no espaço intermembranas e pela MnSOD na matriz mitocondrial, com geração de radical hidroxil a partir do H_2O_2 pela reação de Fenton [Shadel and Horvath, 2015].

1.4.2.1. MnSOD: a isoforma mitocondrial

A MnSOD é a principal enzima antioxidante presente nas mitocôndrias e é considerada essencial para a sobrevivência dos organismos aeróbios. Alguns estudos com animais transgênicos observaram que camundongos knockout para a MnSOD não sobreviveram muitos dias após o nascimento, ou seja, a inativação completa do gene desta enzima foi letal para os animais, principalmente devido à cardiomiopatia e neurodegeneração causada pela falta de expressão da enzima [Miriyyala et al., 2012]. Por outro lado, animais knockout para as enzimas CuZnSOD e GPx não apresentaram esta mortalidade. Acredita-se que esta importância fundamental está relacionada com o papel da MnSOD em manter a concentração de superóxido em baixos níveis, impedindo um desequilíbrio do estado redox [Bresciani et al., 2015; Miriyyala et al., 2012].

Considerando o seu papel fundamental na dismutação do superóxido e, conseqüentemente, na detoxificação das ROS, a MnSOD atua tanto protegendo as mitocôndrias e impedindo que haja disfunção na atividade mitocondrial e no fornecimento energético para as células, quanto na proteção celular contra o estresse oxidativo [Candas and Li, 2014]. Por conta disso, a MnSOD é importante em diversos sistemas biológicos, principalmente os que demandam maior carga energética, como o sistema cardiovascular, o cérebro, o fígado e os músculos esqueléticos [Bresciani et al., 2015; Palma et al., 2020]. Para além da sua ação antioxidante, a MnSOD também influencia em outras funções celulares, regulando a atividade de diversos fatores de transcrição, como o fator 1-alfa induzido por hipóxia (HIF-1 α).

1.4.2.2. O fator de transcrição HIF-1 α

Como o próprio nome indica, o HIF-1 α é um fator de transcrição envolvido na resposta à hipóxia. Este fator está envolvido no desenvolvimento dos corpos carotídeos, quimiorreceptores localizados na bifurcação das artérias carótidas (vaso que conduz o sangue para o cérebro), cujas células respondem de forma rápida à diminuição da oferta

de O₂ para o organismo aumentando a frequência respiratória. Além disso, também regula as respostas à hipóxia a médio e longo prazo, possuindo um papel importante como sensor de oxigênio e principal regulador das respostas celulares, como angiogênese, metabolismo da glicose e proliferação/sobrevivência celular, à privação de oxigênio [Gunton, 2020].

Quando em normóxia, a presença do oxigênio estabiliza as enzimas hidroxilases que mantêm o HIF-1 α silenciado através de hidroxilação. Uma vez que as concentrações de oxigênio estão baixas, há inibição das hidroxilases e, conseqüentemente, ativação do HIF-1 α , que é translocado para o núcleo e ativa as vias adaptativas da resposta à hipóxia [Corrado and Fontana, 2020]. As mudanças metabólicas promovidas pela ativação destas vias são importantes em diversas alterações patológicas, como a angiogênese, regeneração de tecidos, diabetes e resposta anti-inflamatória. Entretanto, em outras doenças, pode contribuir para a indução e progressão de vias patológicas. No câncer, por exemplo, a ativação do HIF-1 α favorece o crescimento, invasão e sobrevivência das células tumorais. O mesmo ocorre na HAP, onde foi demonstrado que a inibição do gene do HIF-1 α foi eficaz em reduzir tanto o remodelamento vascular pulmonar quanto o cardíaco [Corcoran and O'Neill, 2016; Corrado and Fontana, 2020]. Nesse sentido, alguns genes regulados pelo HIF-1 α que são importantes nas vias metabólicas envolvidas na evolução da HAP são os da enzima lactato desidrogenase (LDH), que catalisa a produção de lactato a partir do piruvato; das piruvato desidrogenase quinases (PDK), que inibem a produção de acetil-CoA catalisada pela PDH; da HK, que converte a glicose em G6P; e da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), que catalisa a primeira reação da PPP [Corcoran and O'Neill, 2016].

1.4.2.3. A via metabólica das pentoses-fosfato

A PPP está intimamente ligada à via da glicólise, uma vez que, quando a glicose entra na célula, antes da formação de piruvato, é fosforilada, gerando o metabólito inicial G6P. O G6P, por sua vez, é utilizado na PPP para iniciar uma série de reações que têm como um de seus produtos o NADPH [Cho et al., 2018]. De fato, a formação de NADPH é um dos principais objetivos desta via metabólica, pois esta molécula é essencial para suprir as células com elétrons de alta energia e seus equivalentes, importantes na manutenção do seu equilíbrio oxidoreductor. Além disso, o NADPH está envolvido em

processos que atuam contra o estresse oxidativo, principalmente detoxificando as ROS produzidas durante a OXPHOS e reciclando a GSH no ciclo das glutationas, e em mecanismos de detoxificação e na ação defensiva dos macrófagos. Outro resultado importante da PPP é a geração de ribose-5-fosfato (R5P), que é utilizado como precursor para a biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos [Stincone et al., 2015].

A primeira etapa da PPP ocorre com a conversão do G6P em 6-fosfoglucolactona (6PG), reação catalisada pela G6PD. O 6PG é, então, convertido em R5P pela enzima 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGD). Ambas as reações estão acopladas à redução do NADP^+ , formando o NADPH. Até a formação da R5P, as reações envolvidas fazem parte do ramo oxidativo da PPP, mas, as reações que se sucedem a partir deste metabólito fazem parte do ramo não oxidativo da via [Cho et al., 2018; Stincone et al., 2015; Tang, 2019].

Como já citado, a prevenção do estresse oxidativo através da manutenção da homeostase redox e o suprimento de precursores de nucleotídeos e aminoácidos são funções bioquímicas da PPP. Nesse sentido, esta via está envolvida em processos regulatórios como a expressão de genes para atuar em resposta ao desequilíbrio redox e a adaptação à reconfiguração metabólica presente em células proliferativas. Considerando sua importância, a deficiência ou disfunção da atividade das enzimas que atuam na PPP estão implicadas em patologias como doenças neurodegenerativas e anemia hemolítica [Cho et al., 2018; Tang, 2019]. De fato, a deficiência da G6PD é a alteração genética mais comum em humanos e os indivíduos com esta alteração ficam vulneráveis aos efeitos tóxicos do estresse oxidativo induzido por certos fármacos [Stincone et al., 2015]. Em relação às doenças cardiovasculares, alguns estudos defendem que a diminuição da atividade da G6PD e da 6PGD tem efeitos deletérios, pois estão implicadas no aumento da pressão sanguínea, ao risco de infarto e disfunção contrátil. Outros estudos, entretanto, mostram que a deficiência nestas enzimas tem efeito cardioprotetor, estando relacionada ao menor risco de desenvolver doenças ateroscleróticas e a inibição da proliferação de células endoteliais e músculo liso de vasos pulmonares. Pode considerar, então, que o efeito benéfico ou prejudicial da disfunção nas enzimas da PPP varia conforme a patologia e o tipo celular [Dore et al., 2021]. Em relação à HAP, ainda há poucos estudos na literatura onde a PPP foi analisada, mas, na maioria deles, uma super ativação da G6PD foi relacionada com a disfunção do VD e o aumento do remodelamento vascular pulmonar, associado com a disfunção mitocondrial [Boehme et al., 2016; Kitagawa et al., 2021].

1.4.3. Regulação da biogênese e atividade mitocondrial

Para que possa exercer seu papel nas células, as mitocôndrias estão em constante renovação, ou seja, novas mitocôndrias são produzidas a partir das existentes, quando estas estão danificadas e sofrem mitofagia (a autofagia específica destas organelas). Este processo é conhecido como biogênese mitocondrial e é essencial para a manutenção da homeostase mitocondrial [Popov, 2020]. Entre as moléculas envolvidas neste processo, o coativador 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PGC-1 α) é considerado o principal regulador. O PGC-1 α é um importante fator de transcrição celular e pode ser ativado através de fosforilação pela proteína quinase ativada por AMP (AMPK) ou por desacetilação causada pela sirtuina 1 (SIRT1). Uma vez ativado, o PGC-1 α é translocado para o núcleo, onde promove a transcrição de outras proteínas, como a enzima CS, considerada, também, um marcador de massa mitocondrial nas células [Zurlo et al., 2018], o fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (NRF2), a proteína O1 da família forkhead (FOXO1) e o fator de transcrição A (TFAM), que, por sua vez, favorecem a transcrição de diversas proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa, β -oxidação dos ácidos graxos e sistema antioxidante [García-Niño et al., 2021].

1.4.3.1. A via de sinalização SIRT1/PGC-1 α

O PGC-1 α é um coativador transcricional que atua sobre a regulação de diversos genes envolvidos na homeostase térmica, metabolismo da glicose e função mitocondrial. Sua expressão é aumentada em tecidos com grande quantidade de mitocôndrias e alto metabolismo oxidativo e energético, como o coração, cérebro, tecido adiposo marrom e músculo esquelético [Liang and Ward, 2006; Sunter et al., 2020]. Atualmente, este coativador é considerado o principal regulador da biogênese mitocondrial e do metabolismo oxidativo, com ação de diminuição dos níveis de ROS celulares através da supra regulação de enzimas antioxidantes, como a SOD. De fato, durante o desenvolvimento do coração, por exemplo, a principal fonte de energia para os cardiomiócitos após o nascimento passa a ser a oxidação de ácidos graxos, havendo um aumento da biogênese de mitocôndrias para suprir esta demanda, que é precedida por um aumento drástico da expressão da PGC-1 α [Finck and Kelly, 2007; Popov, 2020]. Além disso, o aumento anormal de ROS devido à disfunção mitocondrial está associado com

uma diminuição da expressão do PGC-1 α em diversas doenças [Bost and Kaminski, 2019].

A ativação do PGC-1 α ocorre quando a molécula é fosforilada (pela AMPK) ou desacetilada pela SIRT1, uma proteína importante em diversas vias metabólicas e imunológicas. A SIRT também desacetila e ativa diversos outros fatores envolvidos em vias do metabolismo, sobrevivência celular e de atividade endotelial, com o fator nuclear κ B (NF κ B), a FOXO1, a eNOS e o HIF-1 α [Yu et al., 2018]. Além de ser uma molécula com um vasto repertório de genes por ela regulados, a SIRT1 também é considerada um sensor metabólico e redox de alterações do estado nutricional e energético celular [Tang, 2016]. Além disso, é ativada por diversos compostos utilizados como tratamento para doenças cardiovasculares na pesquisa experimental, como o resveratrol. De fato, este composto antioxidante, encontrado principalmente nas uvas, é considerado um ativador da SIRT1 e seu efeito sobre a ativação da via SIRT1/PGC-1 α é relacionado com um efeito cardioprotetor em doenças cardiovasculares, cujos mecanismos incluem a diminuição do estresse oxidativo e ativação da MnSOD, aumento da expressão e atividade das proteínas relacionadas ao metabolismo do cálcio e indução de genes envolvidos na biogênese mitocondrial e fosforilação oxidativa [Bonnet-Rousselot, 2016; Tang, 2016].

1.5. Alterações do metabolismo redox e mitocondrial induzidas pela HAP

A alteração da homeostase redox que leva ao estado celular de estresse oxidativo está envolvido no desenvolvimento da HAP e é associada à ativação da resposta inflamatória, proliferação e resistência à apoptose das células vasculares pulmonares [Bello-Klein et al., 2018]. O aumento da geração de ROS em detrimento das moléculas antioxidantes durante a HAP já foi amplamente estudada em pesquisas experimentais e clínicas. De fato, marcadores de estresse oxidativo são encontrados em pulmões e VD de humanos que sofrem da doença e animais com HAP induzida em laboratório. Nestes últimos, a geração descontrolada de ROS é ocasionada em razão da elevada atividade das Nox, da xantina oxidase, da NOS endotelial (eNOS) e da disfunção mitocondrial. Como consequência disso, há aumento da proliferação celular e da fibrose nos vasos pulmonares, principalmente nas arteríolas, causando remodelamento vascular pulmonar, além da oxidação de proteínas essenciais na regulação do tônus vascular [Mikhael et al., 2019]. Além de estar envolvido no remodelamento vascular pulmonar cujas implicações favorecem a disfunção do VD, o estresse oxidativo está presente também no tecido

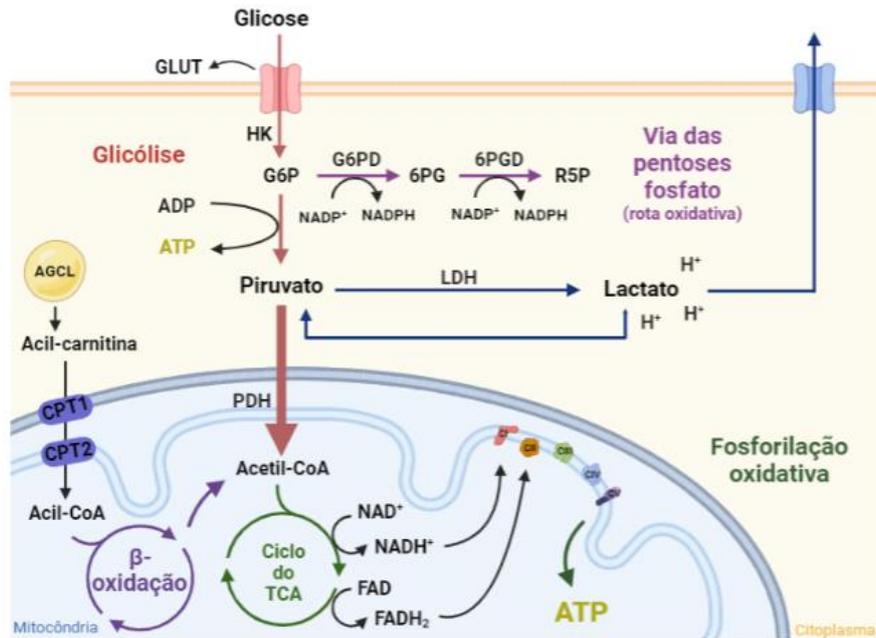
cardíaco direito, que é mais vulnerável a este desequilíbrio redox do que o VE. Esta vulnerabilidade foi relacionada com a ineficácia do VD em regular e aumentar a expressão da MnSOD, como ocorre no VE [Shults et al., 2018].

Principalmente na última década, pesquisadores têm estudado a disfunção mitocondrial característica da HAP e observado a importância deste desfecho para o entendimento da patofisiologia da doença. De fato, a disfunção da cadeia respiratória mitocondrial é uma importante causa do aumento anormal nos níveis de ROS e do uso ineficiente do oxigênio nas células, fatores que estão relacionados com o processo inflamatório crônico presente na HAP [Alruwaili et al., 2019]. O controle de qualidade mitocondrial, ou seja, a regulação da biogênese mitocondrial e da mitofagia também está prejudicado nesta doença. Experimentos demonstraram que a massa mitocondrial está severamente reduzida na HAP, fato relacionado com a diminuição de marcadores da biogênese mitocondrial, como o PGC-1 α e a SIRT1, e aumento de marcadores mitofágicos [Suliman and Nozik-Grayck, 2019].

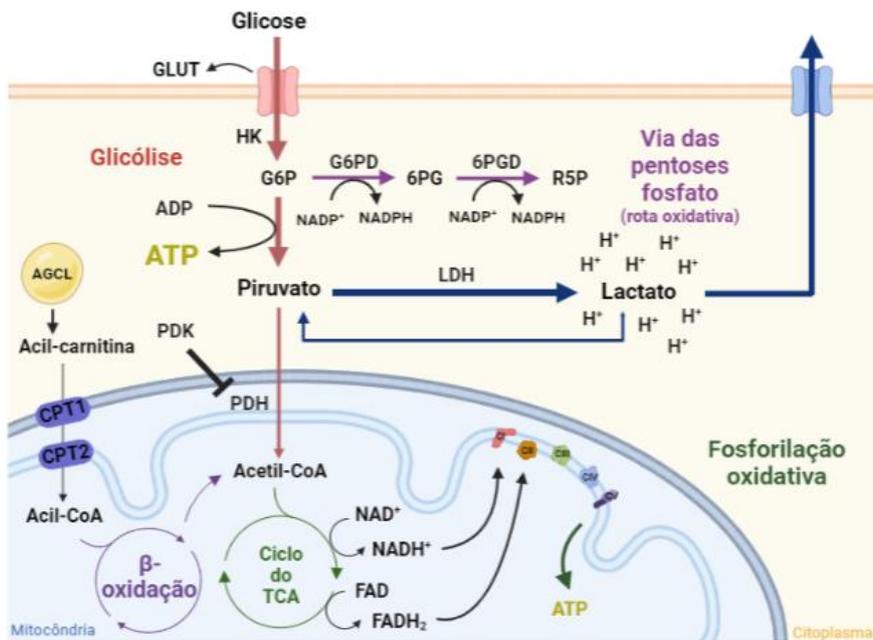
Um fator muito importante associado à HAP é em relação às alterações no metabolismo energético das células envolvidas no desenvolvimento da doença. Neste sentido, é descrito na literatura que, em modelos animais e pacientes com HAP, tanto PASMCs e células endoteliais das artérias pulmonares (PAECs) como cardiomiócitos apresentam uma alteração metabólica na qual a fonte energética principal deixa de ser a oxidação da glicose e passa a ser uma glicólise lactogênica. Isso quer dizer que, ao invés do piruvato gerado a partir da glicose ser transportado para a mitocôndria para formar acetil-CoA e iniciar os processos que levam à fosforilação oxidativa, este é utilizado para produzir lactato, reação catalisada pela enzima LDH, ainda no citosol, promovendo aumento da glicólise. O lactato, por sua vez, promove uma acidificação do ambiente celular, de forma similar ao que ocorre na formação de diversos tipos de tumores, favorecendo a atividade proliferativa anormal das células. Esta mudança metabólica, que se apresenta tanto no desenvolvimento de tumores quanto nas células da vasculatura pulmonar e VD em pacientes com HAP, é chamado de Efeito Warburg [Suliman and Nozik-Grayck, 2019] (Fig. 4). Um dos fatores de transcrição apontados como iniciador do Efeito Warburg é o HIF-1 α , uma vez que ele ativa as PDK, responsáveis por inibir a enzima PDH. Uma vez que a PDH está inibida, há diminuição da conversão de piruvato em acetil-CoA por ela, o que leva à mudança de rota metabólica no sentido da produção de lactato, catalisada pela LDH [Leopold and Maron, 2016]. O estresse oxidativo contribui diretamente para a estabilização e translocação do HIF-1 α para o núcleo celular,

local onde exerce sua função de ativação das proteínas envolvidas neste desvio metabólico, como a já citada PDK e os transportadores de glicose (GLUTs). Os GLUTs, por sua vez, podem ser regulados pela enzima glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β), que, quando ativada, promove aumento da expressão destes transportadores, favorecendo a atividade glicolítica. Porém, a inativação da GSK-3 β através da sua fosforilação está relacionada com menores níveis de GLUT, diminuindo a disponibilidade de glicose para as células, um fator importante para impedir o efeito Warburg e, ainda, a atividade proliferativa de alguns tipos celulares [Kraus et al., 2016].

Na HAP, a mudança metabólica do efeito Warburg prejudica a função mitocondrial, causando hiperpolarização da sua membrana, aumentando os níveis de citocinas inflamatórias e aumentando, ainda mais, os níveis intracelulares de ROS [Alruwaili et al., 2019]. Além da ação sobre vias de sinalização importantes para a atividade celular, as ROS também prejudicam a função de canais de K⁺ voltagem-dependentes da membrana plasmática e dos canais de Ca²⁺ voltagem-dependentes da membrana mitocondrial. Este prejuízo leva ao acúmulo de K⁺ no meio intracelular e promove o influxo de Ca²⁺ para o citosol a partir das mitocôndrias, aumentando seus níveis citosólicos e induzindo a constrição das células de músculo liso presente na vasculatura pulmonar. Este cenário iônico acaba, também, promovendo a proliferação e inibindo a apoptose destas células, contribuindo ainda mais para o desenvolvimento dos sinais característicos do remodelamento vascular pulmonar presente na HAP [Aggarwal et al., 2013; Cottrill and Chan, 2013].



Metabolismo energético normal



Efeito Warburg na HAP

Figura 4. Comparação entre os principais aspectos do metabolismo energético normal e as alterações metabólicas referentes ao efeito Warburg que ocorre na HAP. Durante o metabolismo energético normal, a glicólise e a fosforilação oxidativa são as principais fontes de ATP, com favorecimento para a fosforilação oxidativa, que gera maior quantidade de moléculas de ATP, de forma mais eficiente. Neste cenário, a maior parte do piruvato é translocado para a mitocôndria e uma menor quantidade é convertida em lactato. Em resposta às baixas concentrações de oxigênio, sugere-se que ocorre o efeito Warburg, que consiste em um desvio metabólico no sentido de favorecer a via glicolítica em detrimento da fosforilação oxidativa.

Neste caso, há aumento da expressão dos transportadores GLUT, aumentando a entrada de glicose na célula e a geração de piruvato, com conseqüente aumento da geração de ATP nesta reação. Além disso, a PDH é inibida pelas PDK, reduzindo a conversão de piruvato em acetil-CoA na mitocôndria e causando disfunção dos processos envolvidos na geração de ATP nesta organela. No citoplasma, há aumento exagerado da produção de lactato a partir do piruvato, causando acidificação do ambiente celular. 6PG, 6-fosfoglucoactona; 6PGD, 6-fosfoglucoactona desidrogenase; AGCL, ácidos graxos de cadeia longa; CPT1, carnitina palmitoiltransferase 1; CPT2, carnitina palmitoiltransferase 2; G6P, glicose-6-fosfato; G6PD, glicose-6-fosfato desidrogenase; GLUT, transportador de glicose; HK, hexoquinase; LDH, lactato desidrogenase; PDH, piruvato desidrogenase; PDK, piruvato desidrogenase quinase; PPP, via das pentoses fosfato; R5P, ribose-5-fosfato. Criada em BioRender.com.

1.6. Metabolismo redox e mitocondrial no cérebro

Uma vez que o cérebro consome, aproximadamente, 20% de todo o O₂ levado para o organismo através das células sanguíneas, a geração de ROS neste órgão é alta [Bresciani et al., 2015]. Em baixas ou moderadas concentrações, estas moléculas são importantes para o desenvolvimento e função das células neuronais, entretanto, altas concentrações causam danos e estão relacionadas com a maioria das doenças neurodegenerativas. O alto consumo de O₂, aliado ao fato de ser um órgão cuja composição é rica em ácidos graxos poliinsaturados, porém modesto em quantidade de defesas antioxidantes, faz com que o cérebro fique suscetível a estes danos causado pelas ROS [Salim, 2017]. Apesar da baixa concentração de antioxidantes, a presença das enzimas SOD, CAT e GPx, e das glutations, são essenciais para a manutenção de níveis fisiológicos de ROS. Quando isso não acontece, o desequilíbrio redox deixa o cérebro muito vulnerável ao dano e disfunção celular [Lee et al., 2021].

A atividade mitocondrial é fundamental para a transmissão sináptica e sobrevivência de células neuronais. Sendo responsável por consumir aproximadamente 25% da glicose circulante, o cérebro depende quase exclusivamente da fosforilação oxidativa para suprir a sua alta demanda energética. Com o envelhecimento ou o estabelecimento de uma doença neurodegenerativa, uma das principais conseqüências para o cérebro é a disfunção mitocondrial, que está associada com o mau funcionamento da CTE, aumento da despolarização da membrana, diminuição do processo de mitofagia e dano oxidativo ao DNA mitocondrial [Gudenschwager et al., 2021]. Além disso, estudos observaram um papel importante da MnSOD em doenças neurodegenerativas,

sendo implicada como principal causa de instabilidade das defesas antioxidantes nestas doenças [Bresciani et al., 2015].

Sendo assim, o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial são considerados os mecanismos primários de dano no cérebro devido a um estímulo que cause aumento de ROS e RNS. O dano contínuo nas moléculas de lipídeos, proteínas e DNA causado pelas ROS/RNS e a disfunção metabólica causada pela atividade mitocondrial alterada desencadeiam os mecanismos secundários de dano cerebral, como a excitotoxicidade, distúrbio do metabolismo do ferro, liberação de citocinas inflamatórias e morte celular. Nesse sentido, a sinalização parácrina entre neurônios, astrócitos e células gliais desempenha um papel essencial para ativar as defesas antioxidantes e retardar os processos de neurodegeneração e neurogênese defeituosa [Lee et al., 2021].

1.7. Modelos experimentais de HAP

Devido a sua patogênese multifatorial e ao fato de não haver uma cura para a doença, a HAP é um importante foco de pesquisas em laboratórios do mundo todo. Dessa forma, diversos modelos foram desenvolvidos e podem ser utilizados para a reprodução experimental da doença em laboratório. Entretanto, é importante destacar que ainda não há um modelo pré-clínico que replica completamente as características da HAP de humanos [Dignam et al., 2021].

Atualmente, o modelo de indução de hipóxia crônica (HC) combinado com a administração de um fármaco (SU5416, semaxanib) inibidor do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (Sugen + hipóxia ou SuHx) é um dos mais utilizados para estudo de novos alvos terapêuticos para HAP, podendo ser induzido em camundongos e ratos [Bueno-Beti et al.]. Para a HC, é utilizada uma câmara de hipóxia, onde os animais são expostos a um ambiente com apenas 8-10% de O₂ por um período de 3-4 semanas (a concentração de oxigênio e o tempo de exposição variam conforme o tipo e/ou a raça do animal) [Jasińska-Stroschein, 2021]. O SU5416 geralmente é administrado por via subcutânea em dose única ou semanal de 20 mg/kg, dependendo do protocolo [Bueno-Beti et al.; Dignam et al., 2021]. Além deste, o modelo cirúrgico de bandagem da artéria pulmonar, que consiste da constrição mecânica do tronco pulmonar, e modelos genéticos, como, por exemplo, camundongos com deleção do gene do receptor do tipo 2 da proteína morfogenética óssea (BMP-2) e camundongos com superexpressão de interleucina-6

(IL-6), são bastante utilizados na pesquisa experimental, com desfechos compatíveis com os desenvolvidos pela HAP em humanos [Dignam et al., 2021].

A indução de HAP por exposição à hipóxia crônica (HC) ou administração de monocrotalina (MCT) em pequenos roedores são duas das formas mais antigas de estudar a doença, sendo considerados modelos experimentais clássicos, uma vez que reproduzem alguns dos sinais mais comuns da doença, principalmente no que se refere ao remodelamento vascular pulmonar e insuficiência do VD [Sztuka et al., 2017]. A administração de MCT é um modelo simples e facilmente reproduzido, consistindo na injeção pelas vias intraperitoneal ou subcutânea deste fármaco diluído nos animais. A MCT é um alcaloide pirrolizidínico proveniente da planta *Crotalaria spectabilis*, considerado tóxico. Sendo assim, este composto é administrado no organismo e metabolizado no fígado pelas oxidases do citocromo P-450, gerando metabólitos que causam danos vasculares e levam ao desenvolvimento da HAP [Gomez-Arroyo et al., 2012]. A dose de MCT e a via de administração também variam neste modelo conforme o tipo e a raça do animal utilizado, sendo mais frequentemente utilizada em ratos da raça Wistar ou Sprague Dawley, que necessitam de apenas uma dose de MCT (60-80 mg/kg) para desenvolver a doença, com índice de mortalidade de quase 100% após 6-8 semanas (o tempo utilizado para desenvolvimento da HAP em ratos é, na maioria dos estudos, de 3 semanas, quando o VD já está insuficiente) [Dignam et al., 2021]. Em camundongos, no entanto, a MCT age de forma diferente e uma dose única do composto não é capaz de desenvolver a doença, sendo necessária a administração de várias doses, por um período mais longo. Mesmo assim, o desenvolvimento de HAP por este modelo não é tão severo em camundongos como é nos ratos [Nogueira-Ferreira et al., 2015]. A principal raça de camundongo utilizada nestes estudos é a C57BL/6 [Carman et al., 2019].

De alguns anos para cá, diversos autores questionam a eficácia destes modelos mais antigos em reproduzir os sinais da HAP vistos na clínica e, conseqüentemente, a eficácia dos possíveis novos tratamentos encontrados em estudos utilizando estes modelos, dando destaque maior para estudos com os modelos experimentais mais atuais citados anteriormente. Vale salientar, entretanto, que os principais tratamentos utilizados atualmente em pacientes com HAP foram previamente estudados utilizando estes dois modelos pré-clínicos clássicos, fato que demonstra a importância destes para a evolução da Medicina [Dignam et al., 2021].

1.8. *Tratamentos e alvos terapêuticos*

As terapias atuais utilizadas no tratamento da HAP envolvem, principalmente, o uso de fármacos associados a vias envolvidas na modulação da vasculatura pulmonar, que têm como objetivo inibir a vasoconstrição associada ao aumento da RVP. Por conta disto, a terapia clássica e aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration – agência federal dos Estados Unidos) atualmente para pacientes com HAP ainda é focada em medicamentos que atuam sobre vias vasodilatadoras [Parikh et al., 2019]. Uma destas vias é a do ON, que possui ação vasodilatadora através da ligação com a enzima guanilato ciclase (GC) e consequente produção de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), responsável por promover a vasodilatação de arteríolas e a supressão da proliferação celular. Neste sentido, os fármacos sildenafil e tadalafil têm ação sobre esta via, uma vez que mantêm os níveis de GMPc e impedem que o mesmo seja degradado pela enzima fosfodiesterase-5 (PDE5), sendo, portanto, inibidores da PDE5 [Archer and Michelakis, 2009]. O fármaco riociguat age de maneira similar sobre a manutenção dos níveis de GMPc, mas sua ação se dá sobre a GC, estimulando-a independentemente do ON [Ghofrani et al., 2013].

Outra via importante em relação ao remodelamento dos vasos pulmonares é a da ET-1, que possui ações antagônicas dependendo do receptor ao qual se liga. Quando ligada ao seu receptor A (ET_A), a resposta vasoconstritora e proliferativa é desencadeada, mas, ligada ao receptor B (ET_B), media a resposta vasodilatadora [Parikh et al., 2019]. Os principais fármacos utilizados na clínica que atuam sobre esta via são o bosentan e o macitentan, que inibem de forma não seletiva ambos os receptores ET_A e ET_B, e o ambrisentan, que inibe seletivamente apenas o ET_A [Galiè et al., 2008; Pulido et al., 2013; Rubin et al., 2002].

Ainda em relação aos fármacos de ação vasodilatadora, a utilização de análogos de prostaciclina também é realizada na clínica há vários anos, uma vez que esta molécula, liberada de forma endógena pelas células endoteliais, possui propriedade vasodilatadora e antiproliferativa. O epoprostenol e o teprostinil são análogos sintéticos da prostaciclina e podem ser administrados por diferentes vias (oral, subcutânea, intravenosa ou inalatória) [Barst et al., 1996; McLaughlin et al., 2010], já o selexipag promove ativação do receptor IP de prostaciclina, um receptor acoplado a uma proteína-G que promove vasodilatação através da liberação de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) [Sitbon et al., 2015].

Para melhor compreensão sobre o assunto, os fármacos citados anteriormente e utilizados no tratamento convencional da doença, bem como seus alvos de atuação, estão citados na tabela 4, a seguir.

Tabela 4. Farmacoterapia utilizada atualmente no tratamento da HAP.

Fármaco	Mecanismo de ação
Sildenafil e Tadalafil	Inibidores da PDE5, permitem a ação vasodilatadora do ON através do GMPc
Riociguat	Estimula a GC, que induz produção da GMPc e promove vasodilatação
Bosentan e Macitentan	Antagonistas não seletivos dos receptores ET _A e ET _B de ET-1
Ambrisentan	Antagonista seletivo do receptor ET _A
Epoprostenol e Teprostínil	Análogos sintéticos da prostaciclina
Selexipag	Agonista do receptor IP de prostaciclina

ET-1, endotelina 1; ET_A, receptor A de endotelina; ET_B, receptor B de endotelina; GC, guanilato ciclase; GMPc, monofosfato de guanosina cíclico; PDE5, fosfodiesterase-5; ON, óxido nítrico;

Além das opções farmacológicas descritas acima, alguns tipos de intervenções cirúrgicas podem ser utilizadas em pacientes com HAP (e outros tipos de HP), como a manobra cirúrgica de desvio de fluxo sanguíneo da direita para a esquerda (com objetivo de aliviar a pressão sobre o VD). Este procedimento pode ser realizado através da colocação de um stent interatrial ou, ainda, criando uma anastomose entre a artéria pulmonar esquerda e a aorta descendente [Ståcel et al., 2021]. Outra opção deste tipo é a implantação de um dispositivo de assistência ao VD, uma espécie de suporte mecânico que auxilia na função de bomba do coração [Punnoose et al., 2012]. A utilização do método de oxigenação através de membrana extracorpórea (ECMO) também é uma opção viável para pacientes em estado grave de insuficiência cardíaca. Este procedimento consiste na utilização de um circuito de oxigenação por membrana extracorpórea veno-arterial, que consiste na circulação sanguínea fora do corpo, uma vez que o sangue venoso é desviado, através da veia femoral e da veia jugular direita, utilizando uma bomba que preserva o fluxo sanguíneo e substitui a função cardíaca e passa por uma membrana de

oxigenação que substitui a função pulmonar, devolvendo o sangue oxigenado para o corpo através da artéria femoral [Abrams et al., 2013]. Esta intervenção cirúrgica, entretanto, é considerada uma última opção de suporte de vida e uma ponte para casos de transplante de pulmões ou transplante em bloco de pulmões e coração, quando todas as outras opções terapêuticas estão esgotadas [Stăcel et al., 2021].

Embora as intervenções farmacológicas e cirúrgicas descritas sejam eficazes em melhorar a qualidade de vida, os prejuízos hemodinâmicos e as hospitalizações de pacientes com HAP, nenhuma delas tem como alvo direto os fatores-chave envolvidos na patogênese da doença, de forma que promova a sua cura ou, ainda, impeça o seu desenvolvimento [Zolty, 2021]. No caso dos procedimentos cirúrgicos citados, os profissionais da saúde consideram que uma baixa porcentagem de pacientes está apta para passar por estes processos e mesmo os que podem se beneficiar destas opções terapêuticas ainda sofrem com as repercussões pós-operatórias e possíveis efeitos colaterais dos procedimentos [Stăcel et al., 2021].

Desta forma, apesar dos avanços ocorridos nos últimos 25 anos em relação à compreensão da patofisiologia e, conseqüentemente, das estratégias terapêuticas contra a HAP, esta doença ainda está associada a uma alta taxa de morbidade e mortalidade, e a busca por novos tratamentos e alvos terapêuticos ainda é um desafio tanto na pesquisa clínica como na pesquisa experimental. Sendo assim, centros de pesquisa do mundo todo trabalham para encontrar um tratamento eficaz que atue sobre vias moleculares envolvidas, por exemplo, na regulação redox, anti-inflamatória, mitocondrial e metabólica da patofisiologia desta doença devastadora [Zolty, 2021].

Uma possibilidade terapêutica que mostrou resultados promissores nos últimos anos e foi alvo de investigação do presente trabalho é a utilização de vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais.

1.9. Vesículas extracelulares

Para um melhor entendimento em relação ao tratamento mencionado anteriormente, uma introdução quanto às propriedades, características e funções das vesículas extracelulares (EVs) será abordada nos subtópicos a seguir.

1.9.1. Conceito e caracterização das EVs

As EVs são vesículas de membrana que podem ser liberadas por diferentes tipos celulares e participam do processo de comunicação intercelular. De forma geral, são compostas por diferentes tipos de lipídeos e carregam diversos tipos de moléculas em seu interior, como proteínas e ácidos nucleicos, incluindo grandes quantidades de RNA mensageiro (mRNA) e microRNAs (miR) [Raposo and Stoorvogel, 2013]. Algumas proteínas estão presentes em todas as EVs e são utilizadas para caracterização da presença destas vesículas em uma amostra, como a Alix, TSG101, RAB e outras pequenas GTPases, flotilinas, anexinas, CD9, CD63, CD81, entre outras [Araujo-Abad et al., 2022].

Atualmente, as EVs são divididas em três grupos, que se distinguem de acordo com sua origem, formação e tamanho. As EVs de maior tamanho são chamadas de corpos apoptóticos, variando de 1000 nm a 5000 nm, e são liberados durante o processo de “bolhamento” de uma célula apoptótica [Yáñez-Mó et al., 2015]. As microvesículas (ou micropartículas, ou ectossomos) são o grupo de EVs de tamanho intermediário, variando entre 100 nm e 1000 nm, formadas a partir do brotamento externo diretamente da membrana plasmática celular [Yáñez-Mó et al., 2015]. O grupo de EVs de menor tamanho, variando entre 30 nm e 100 nm, corresponde aos exossomos, cujo processo de formação e liberação é mais complexo que os anteriores. Através do processo de endocitose celular, há a formação de endossomos iniciais (EI), que posteriormente amadurecem para endossomos tardios ou, como são mais comumente chamados, corpos multivesiculares (CMV), uma vez que ocorre o acúmulo de vesículas intraluminais (VIL) em seu interior no processo. Na maioria das células, os CMV são degradados pelos lisossomos, mas, em alguns tipos de células, eles se fundem à membrana plasmática, liberando o seu conteúdo, ou seja, os exossomos, por exocitose para o meio extracelular [Colombo et al., 2014]. Uma ilustração resumida de como ocorre a formação e liberação dos três tipos de EVs pode ser conferida na figura 3.

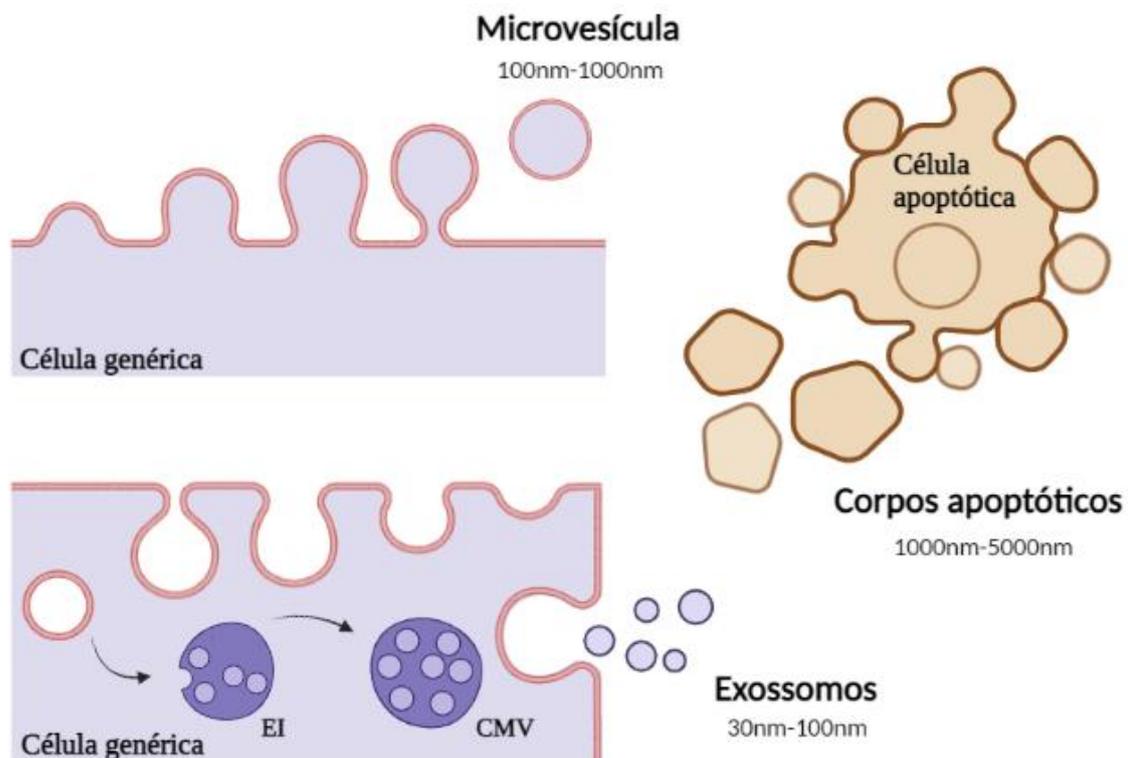


Figura 5. Biogênese e liberação de vesículas extracelulares. Os corpos apoptóticos são liberados a partir de células em processo de apoptose, como se fossem “bolhas”. As microvesículas (ou micropartículas) são formadas a partir da membrana plasmática, por brotamento externo. Os exossomos são formados dentro de endossomos que, posteriormente, se transformam em corpos multivesiculares, que, por sua vez, se fundem à membrana plasmática e liberam os exossomos para o meio externo. EI, endossomo inicial; CMV, corpo multivesicular. Criada em BioRender.com.

Antigamente, considerava-se que as EVs eram apenas vesículas transportadoras de “lixo” celular, como proteínas danificadas ou outras moléculas desnecessárias. No entanto, principalmente a partir dos anos 2000, muitos estudos começaram a confirmar o importante papel desempenhado por estas vesículas na comunicação celular, tanto em condições fisiológicas como em patologias [Araujo-Abad et al., 2022]. As EVs podem ser liberadas por células maduras do organismo de diferentes tipos e podem ser encontradas em todos os fluidos corporais, como sangue, leite, urina e saliva. A carga destas vesículas depende da sua célula de origem, que utilizam as EVs como agentes de comunicação através de uma sinalização parácrina [Chen et al., 2021].

1.9.2. As EVs circulantes do organismo

A biocomposição das EVs “nativas” que circulam pela corrente sanguínea ou que estão presentes na urina, saliva e leite materno não é única e varia conforme o estímulo, refletindo o estado fisiológico da célula ou tecido a que se origina. Alguns autores observaram que condições estressantes aumentam a quantidade de EVs circulantes, entretanto, nem sempre a variação em relação à quantidade de partículas pode ser mensurada [Yates et al., 2022]. Apesar disto, diversas células liberam EVs continuamente, tanto em condições normais como patológicas, devido ao seu importante mecanismo de comunicação intercelular. As células endoteliais, os cardiomiócitos e as células neuronais (neurônios, astrócitos e células microgliais) são alguns dos tipos celulares com esta capacidade. No cérebro, as EVs participam de processos importantes de proteção das células, mesmo em condições fisiológicas normais. Um processo que ocorre normalmente é a liberação de EVs por neurônios que têm como alvo outras células neuronais, com o objetivo de regular a neurogênese e a manutenção de circuitos neuronais ou mesmo a montagem de novos circuitos, dada a importante característica de plasticidade que estas células possuem [Meldolesi, 2021].

Apesar de sua importante função fisiológica, pode-se inferir que as EVs liberadas por células danificadas por uma doença irão carregar marcadores patológicos característicos desta doença [Yates et al., 2022]. De fato, um estudo de 2013 demonstrou que EVs isoladas do plasma de ratos com HAP induzida por MCT foram capazes de promover o desenvolvimento da doença em ratos saudáveis que receberam injeções contendo estas vesículas [Aliotta et al., 2013]. Mais tarde, este grupo de pesquisa observou que este efeito foi devido, principalmente, aos exossomos presentes na amostra de EVs derivadas dos animais com HAP induzida por MCT. Estes exossomos carregavam, entre outras coisas, diversos miR característicos da doença e presentes em plasma de pacientes com HAP, e acredita-se que, nos animais saudáveis, promoveram sinalização favorável ao remodelamento vascular pulmonar e estabelecimento da doença [Aliotta et al., 2016].

Por outro lado, as EVs também podem ser liberadas por células-tronco (CT), que são utilizadas, com cada vez mais frequência, como opção terapêutica em diversas doenças. Alguns tipos de células utilizadas experimentalmente para tratamento de diferentes patologias são: CT pluripotentes induzidas, CT do fluido amniótico (AFSCs),

CT derivadas de tecido adiposo (ADSCs) e CT derivadas de medula óssea (BMSCs) [Amsar et al., 2022].

1.9.3. Funções das EVs derivadas de células-tronco

Nos últimos anos, têm-se atribuído que o papel terapêutico das CT está relacionado a sua secreção parácrina através da liberação de EVs carregadas de fatores parácrinos. Sendo assim, considera-se que a utilização de tratamento apenas com EVs pode ser uma alternativa mais segura neste tipo de terapia, pois não haveria a desvantagem de introduzir células com capacidade de se replicar ou se diferenciar dentro do organismo [Amsar et al., 2022].

As EVs podem mediar a comunicação intercelular através de interação de contato com a célula-alvo, fusão de membranas ou endocitose. Esta comunicação pode ser feita através da liberação da sua carga, na forma de proteínas ou material genético, principalmente. De fato, sua característica de poder transportar material genético e, assim, trocar informação genética entre células faz com que a utilização das EVs seja muito vantajosa em terapias de reprogramação celular [Araujo-Abad et al., 2022]. Sua função de transporte faz com que as EVs também sejam utilizadas como veículos de transporte e entrega de outras substâncias, como drogas, uma vez que são pequenas, biocompatíveis, pouco citotóxicas e imunogênicas, e podem atravessar a barreira hemato-encefálica [Araujo-Abad et al., 2022]. Outra função importante das EVs é que podem ser utilizadas como biomarcadores, ou seja, indicadores da presença de uma doença em um paciente. Um exemplo disto é que diversas proteínas presentes em exossomos provenientes de fluidos biológicos foram identificadas como biomarcadores para diagnóstico de diferentes tipos de cânceres. Esta possibilidade é muito interessante para aplicação clínica, pois é uma forma minimamente invasiva e agressiva para a realização do diagnóstico e vigilância da doença [Zhu et al., 2020].

Além das funções citadas acima, as EVs derivadas de CT já demonstraram seu papel na atenuação e melhora de diversas doenças, como câncer, aterosclerose, asma, reparo de cartilagem e pele, artrite reumatoide, doença de Alzheimer, doença de Chagas, diabetes, COVID-19 e doenças cardiovasculares [Amsar et al., 2022; Araujo-Abad et al., 2022].

1.9.4. Tratamento com CT-EVs na hipertensão arterial pulmonar

O potencial terapêutico das EVs derivadas de CT para tratamento da HP começou a ser explorado somente a partir de 2012, quando o estudo de Lee e colaboradores demonstrou que a injeção de EVs derivadas de CT mesenquimais (MSCs) em animais com HP induzida por hipóxia foi capaz de proteger o tecido pulmonar e impedir o remodelamento vascular neste órgão [Lee et al., 2012a]. De lá para cá, outros artigos foram surgindo para elucidar ainda mais este potencial terapêutico, em diferentes modelos experimentais de HP e, em maior número, de HAP.

Sendo assim, estudos mostram que EVs de diferentes tipos de CT são capazes de promover a melhora dos desfechos patológicos encontrados na HAP. No estudo de Chen e colaboradores, as EVs foram isoladas a partir de MSCs de medula óssea (de fêmur e tibia) de ratos e, tanto as EVs quanto as MSCs foram injetadas em ratos Sprague Dawley com HAP induzida por MCT. Ao final do experimento, foi observado que as EVs foram eficazes em reduzir o remodelamento vascular pulmonar, a pressão sistólica e a hipertrofia no VD, de forma similar ao grupo que foi tratado com as MSCs, corroborando a ideia de que o uso das EVs traz benefícios de forma semelhante ao uso de CT [Chen et al., 2014]. Em outros dois estudos, pôde-se observar os mesmos efeitos terapêuticos e protetores com a utilização de EVs derivadas de MSCs de cordão umbilical humano. Em um destes, ratos Sprague Dawley com HAP induzida por MCT foram tratados com as EVs por 3 dias e após 21 dias da injeção de MCT, e as medidas foram realizadas 4 dias após o último dia de tratamento [Zhang et al., 2020a]. No segundo estudo, ratos Wistar com HAP induzida por MCT também foram tratados por 3 dias após 21 dias da injeção de MCT, mas as medidas foram feitas 4 semanas após o último dia de tratamento [Zhang et al., 2020b].

O grupo de pesquisa do Dr Olin Liang testou a eficácia do tratamento com EVs derivadas de MSCs de medula óssea humana (hBM-MSCs) em ratos com HAP induzida por protocolo de hipóxia + Sugen-5416 tanto para reverter a doença (com tratamento após o protocolo de indução da HAP) quanto para prevenir o desenvolvimento da doença (com tratamento ao longo do protocolo de indução da HAP). Com isso, foi observado que ambos os protocolos de tratamento foram eficazes e normalizaram parâmetros como a PSVD, a hipertrofia do VD e a muscularização de vasos pulmonares periféricos. Este efeito foi, ainda, relacionado com um aumento do número de macrófagos ativados e de vasos sanguíneos periféricos [Klinger et al., 2020a, 2021]. Utilizando EVs da mesma

origem (a partir de hBM-MSCs) em tratamento de PASMCs em hipóxia *in vitro* e de ratos com HAP induzida por hipóxia, o estudo de Hogan e colaboradores abordou o efeito terapêutico em relação ao metabolismo mitocondrial nestes organismos. Nas PASMCs, a exposição à hipóxia crônica levou à mudança metabólica característica do efeito Warburg. O tratamento com as EVs, entretanto, restaurou a homeostase energética, aumentando a oxidação de glicose e impedindo o dano mitocondrial nestas células. O mesmo efeito foi observado *in vivo*, onde as EVs promoveram melhora do equilíbrio redox e do metabolismo mitocondrial, aumento da oxidação de glicose e impedindo o efeito Warburg [Hogan et al., 2019].

Considerando que o efeito positivo das EVs sobre a HAP pode estar relacionado com a regulação do metabolismo mitocondrial e que as alterações nas células endoteliais pulmonares são um dos pontos iniciais do desenvolvimento da doença, a superexpressão da MnSOD em células endoteliais pode apresentar potencial terapêutico na HAP.

1.10. Efeito terapêutico da superexpressão da MnSOD

Como já discutido nos tópicos anteriores, a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo são processos patológicos comuns em diversas doenças. Dada a importância da MnSOD para a regulação da função e capacidade antioxidante mitocondrial e, com isso, para a manutenção do equilíbrio redox, diversos trabalhos já testaram e observaram o efeito protetor que a superexpressão desta enzima pode promover em algumas doenças.

No estudo de Chen e colaboradores, a superexpressão da MnSOD nas mitocôndrias do coração de camundongos transgênicos foi capaz de proteger o miocárdio após dano causado pelo processo de isquemia seguido de reperfusão. Este efeito foi acompanhado pela diminuição da atividade da LDH, enzima importante na via metabólica ativada no efeito Warburg [Chen et al., 1998]. Em outro estudo, a expressão aumentada da MnSOD em coração de ratos idosos foi capaz de prevenir o estresse oxidativo, a fibrose e a apoptose relacionados ao processo de envelhecimento [Kwak et al., 2015]. Além disso, a superexpressão da MnSOD está relacionada com um efeito benéfico no tratamento anticâncer, uma vez que já foi demonstrado sua eficácia na supressão de tumores em diversos tipos de cânceres e, ainda, seu efeito protetor de tecidos como o coração e o cérebro contra os efeitos citotóxicos das drogas usadas na quimioterapia,

como a adriamicina [Holley et al., 2012]. Até o momento, não há trabalhos publicados onde o efeito da superexpressão da MnSOD tenha sido investigado na HAP.

2. Hipótese e objetivos

2.1. Hipóteses

As vesículas extracelulares derivadas de soro de animais com hipertensão arterial pulmonar carregam marcadores comuns ao processo patológico da doença e atuam como sinalizadores interórgãos.

O tratamento com vesículas extracelulares provenientes de células mesenquimais derivadas de medula óssea humana é eficaz em prevenir o desenvolvimento da hipertensão arterial pulmonar e seu efeito se deve às alterações promovidas sobre o metabolismo mitocondrial.

A superexpressão da MnSOD em células endoteliais é eficaz em prevenir o desenvolvimento da hipertensão arterial pulmonar.

2.2. Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi estudar o papel das vesículas extracelulares provenientes de soro sanguíneo na patofisiologia da hipertensão arterial pulmonar, e das vesículas extracelulares provenientes de células mesenquimais como tratamento para a doença, sob o ponto de vista da modulação da homeostase redox e mitocondrial em diferentes tecidos. Além disso, analisar a eficácia do modelo transgênico de superexpressão da enzima superóxido dismutase mitocondrial como prevenção do desenvolvimento da doença.

2.3. Objetivos específicos

Experimento I:

- Induzir a hipertensão arterial pulmonar em ratos adultos utilizando a monocrotalina;

- Caracterizar o estabelecimento da doença nos animais através de análises hemodinâmicas e morfométricas;
- Isolar as vesículas extracelulares a partir do soro dos animais e caracterizá-las através da análise por NTA e da expressão proteica da flotilina 1;
- Analisar o perfil bioquímico redox no VD e no cérebro, através das seguintes medidas: espécies reativas de oxigênio totais, lipoperoxidação, atividade da NADPH oxidase, atividade enzimática da superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, níveis de sulfidrilas e razão entre glutathione oxidada e reduzida;
- Analisar a via das pentose-fosfato no VD e no cérebro através da medida da atividade das enzimas 6-fosfogluconato desidrogenase e glicose-6-fosfato desidrogenase;
- Analisar a função mitocondrial no VD e no cérebro através da medida das atividades dos complexos II, II-III e IV da cadeia de transporte de elétrons e da enzima citrato sintase, bem como da análise da expressão proteica da MnSOD;
- Verificar a relação do HIF-1 α com as alterações mitocondriais presentes no cérebro;
- Verificar a presença de fatores de transcrição PGC-1 α e sirtuina 1, relacionados com a atividade mitocondrial, nas EVs derivadas do soro dos animais;
- Realizar as análises estatísticas dos dados coletados ao fim dos experimentos.

Experimento II:

- Realizar a cultura celular das células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea humana;
- Isolar as vesículas extracelulares do meio de cultura utilizando a técnica da ultracentrifugação;
- Realizar a caracterização das vesículas extracelulares por NTA e expressão proteica da CD63;
- Avaliar a progressão e estabelecimento da doença nos animais através de análise ecocardiográfica inicial (dia 0) e final (dia 28);
- Induzir a hipertensão arterial pulmonar em camundongos adultos selvagens utilizando a monocrotalina;

- Realizar o tratamento dos camundongos com as vesículas extracelulares derivadas das células-tronco mesenquimais;
- Realizar a coleta de sangue dos animais a cada semana, separar o soro e, posteriormente, isolar as vesículas extracelulares circulantes;
- Avaliar a pressão sistólica no VD através da análise hemodinâmica no dia 28, realizar a eutanásia e coletar os órgãos;
- Avaliar o remodelamento dos vasos pulmonares e do VD através de análise histológica do tecido pulmonar e análise morfométrica do índice de hipertrofia no tecido cardíaco direito;
- Avaliar o efeito do tratamento com as MSC-EVs no metabolismo, através da análise da expressão proteica dos fatores FOXO1, CPT1A, MnSOD e GSK3 β no tecido pulmonar;
- Realizar as análises estatísticas dos dados coletados ao fim dos experimentos.

Experimento III:

- Realizar o desmame da prole de camundongos da linhagem transgênica e separar nos grupos experimentais;
- Adicionar tetraciclina na água de beber dos animais do grupo com expressão normal da MnSOD;
- Avaliar a progressão e estabelecimento da doença nos animais através de análise ecocardiográfica inicial (dia 0) e final (dia 28);
- Induzir a hipertensão arterial pulmonar nos camundongos adultos transgênicos de ambos os grupos experimentais utilizando a monocrotalina;
- Realizar a coleta de sangue dos animais a cada semana, separar o soro e, posteriormente, isolar as vesículas extracelulares circulantes;
- Avaliar a pressão sistólica no VD através da análise hemodinâmica no dia 28, realizar a eutanásia e coletar os órgãos;
- Avaliar o remodelamento dos vasos pulmonares e do VD através de análise histológica do tecido pulmonar e análise morfométrica do índice de hipertrofia no tecido cardíaco direito;
- Realizar as análises estatísticas dos dados coletados ao fim dos experimentos.

3. Materiais e métodos

3.1. Experimento I

Todos os procedimentos experimentais desenvolvidos neste estudo seguiram a Lei 11.794 e as Diretrizes para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS), com o número 33760.

3.1.1. Animais

Neste experimento, foram utilizados 20 ratos Wistar machos adultos, pesando entre 180 e 200g. Os animais foram provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação Animal da UFRGS (CREAL/UFRGS) e, durante o protocolo experimental, foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia (ICBS, UFRGS), agrupados ($n = 4/\text{caixa}$) em caixas de polipropileno (33x17x40 cm), sob condições de iluminação claro/escuro de 12 horas, temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade (55%) controladas, com livre acesso à água e ração.

3.1.2. Protocolo experimental

Os animais foram divididos, de forma randômica, em dois grupos experimentais: Controle ($n=8$) e Monocrotalina ($n=12$). Todos os animais foram pesados semanalmente e, no primeiro dia, este dado foi utilizado para determinar a quantidade de fármaco a ser injetada em cada animal. A MCT foi injetada pela via intraperitoneal na dose única de 60 mg/kg, os animais do grupo Controle receberam apenas solução salina, pela mesma via. O esquema do protocolo realizado pode ser visualizado na figura 3.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Experimento I - Análise da homeostase redox e mitocondrial em ventrículo direito, cérebro e vesículas extracelulares circulantes de ratos com hipertensão arterial pulmonar

GRUPOS EXPERIMENTAIS:

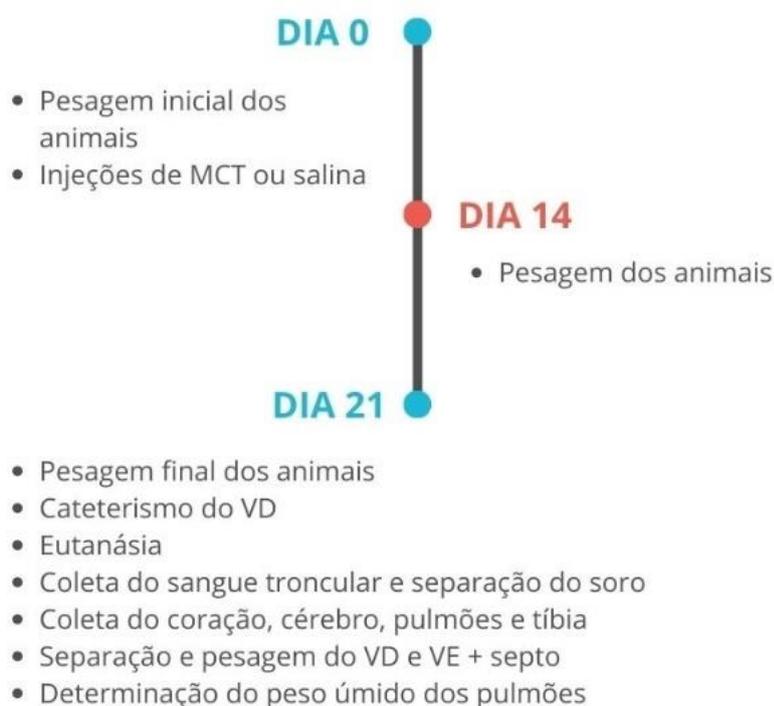


Figura 6. Protocolo experimental do Experimento I.

3.1.3. Análise hemodinâmica

A análise hemodinâmica da pressão diastólica do ventrículo direito (PDVD), da pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD) e da mPAP foi realizada através de cateterismo. Para isso, os animais foram anestesiados, submetidos à tricotomia da região jugular direita e posterior dissecação e isolamento da veia jugular. O fluxo sanguíneo foi obstruído e uma incisão na parede superior do vaso foi realizada para a introdução de um

cateter de polietileno (PE-50) preenchido com solução salina (NaCl 0,9%). O cateter foi inserido até o VD e sua posição foi determinada pela observação da forma de onda característica da pressão ventricular direita. Após estabilização da leitura, a PDVD e a PSVD foram registradas e expressas em mmHg. Os registros foram monitorados utilizando um transdutor de pressão (Strain-Gauge – Narco Biosystem Miniature Pulse Transducer RP-155, EUA) ligado a um amplificador de sinais (Windaq, Dataq Instruments, Inc., EUA) com uma taxa de amostragem de 1000 Hz [Ludke et al., 2010]. A mPAP foi estimada utilizando a seguinte fórmula: $mPAP \text{ (mmHg)} = (0,61 \times PSVD) + 2 \text{ mmHg}$ [Koskenvuo et al., 2010].

3.1.4. Análises morfológicas

Os animais foram pesados a cada 14 dias para determinar o efeito da doença no índice de peso corporal. Para determinar a hipertrofia do VD, o índice de Fulton foi calculado (relação massa VD/[VE + septo]) [Fulton et al., 1952]. Além disso, a congestão pulmonar foi calculada pela razão do peso úmido (pesado no dia da coleta do órgão) pelo peso seco (pesado após incubação em estufa a 60°C durante aproximadamente 15 dias, para estabilização total do peso do órgão) [Farahmand et al., 2004].

3.1.5. Preparação das amostras e cálculo da concentração proteica

Para preparar as amostras de VD e cérebro, os tecidos foram adicionados a uma solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15% (5 ml/g de tecido) mais fluoreto de fenilmetil sulfonil (PMSF) 100 mM. O VD foi homogeneizado por 40 segundos utilizando homogenizador Ultra-Turrax (OMNI Tissue Homogenizer, OMNI International, EUA) e o cérebro foi homogeneizado em um tubo de 1,5 ml aplicando pressão manualmente com um pilão de cerâmica. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 1000 x g e 4°C. O sobrenadante foi coletado para posteriores análises [Llesuy et al., 1985].

A preparação dos tecidos para as análises mitocondriais, no entanto, foi realizada utilizando tampão SETH (sacarose 250 mM, EDTA 2 mM, Trizma base 10 mM e heparina 50 IU/ml, pH 7,4) (1:20 p/v). O VD foi homogeneizado por 40 segundos utilizando homogenizador Ultra-Turrax (OMNI Tissue Homogenizer, OMNI

International, EUA) e o cérebro foi homogeneizado em um tubo de 1,5 ml aplicando pressão manualmente com um pilão de cerâmica. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 750 x g e 4°C [Rosenthal et al., 1987].

A concentração de proteínas em cada amostra foi quantificada pelo método de Lowry, descrito em 1951, utilizando albumina de soro bovino como padrão (1 mg/mL). As amostras foram adicionadas em meio contendo solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 2% em hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N, 1% de solução de sulfato de cobre (CuSO₄.5H₂O) 1%, 1% de solução de tartarato de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆.4H₂O) 2%. O reativo de Folin Ciocalteau foi adicionado às amostras na placa, que foi deixada em temperatura ambiente e em ausência de luz por 30 minutos. Após este período, a leitura foi efetuada em espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200 RT, Biochrom, Reino Unido) a 635 nm.

3.1.6. Isolamento e caracterização das vesículas extracelulares

As EVs foram isoladas de acordo com as instruções do fabricante, utilizando um kit comercial (miRCURY™ Exosome Isolation Kit, Exiqon, Vebæk, Dinamarca), que se baseia no método de precipitação das partículas. Inicialmente, 0,6 ml do soro, obtido do sangue troncular coletado no momento da decapitação, foi centrifugado por 5 min a 10000 x g, para remoção dos restos celulares, e o sobrenadante foi coletado. Em seguida, foi adicionado 0,2 ml do tampão de precipitação presente no kit ao tubo do sobrenadante, que foi misturado em vórtex e incubado por 60 min a 4°C. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 30 min a 1500 x g em temperatura ambiente, e o sobrenadante foi descartado. O pellet resultante foi ressuscitado em 0,3 ml de tampão fosfato-salino (PBS) 1x utilizando o vórtex por 5 a 15 min, em temperatura ambiente.

As EVs circulantes foram caracterizadas através da técnica de análise e rastreamento da concentração e tamanho de nanopartículas presentes na amostra, a Nanosight Tracking Analysis (NTA) [Van Der Pol et al., 2010], utilizando o aparelho Nanosight LM10-HS (Nanosight Ltd., Amesbury, UK)* e da presença da proteína flotilina 1 (FLOT1) [De Gassart et al., 2003], através da expressão proteica analisada pela técnica de Western blot.

*análise realizada no laboratório de pesquisa do Dr. André Ricardo Massensini, com auxílio da Dra. Virgínia Mendes Carregal, no Departamento de Fisiologia e Biofísica do

Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, MG, Brasil).

3.1.7. Concentração total de espécies reativas de oxigênio

A determinação da concentração total de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi realizada utilizando a técnica descrita por Lebel e colaboradores (1992). Esta técnica mensura a concentração de ROS através da interação entre estas e o diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, EUA), que é oxidado e transformado em 2,7-diclorofluoresceína (DCF), molécula que emite fluorescência. Para isto, as amostras foram incubadas com tampão fosfato 20 mM mais KCl (cloreto de potássio) 140 mM (pH 7,4) e DCFH-DA 100 μ M por 30 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. A reação foi medida em espectrofotômetro fluorescente (T80 UV/VIS Spectrometer, PG Instruments, São Paulo, BR), no qual as amostras foram excitadas a 488 nm e a emissão de fluorescência foi coletada a 525 nm. Os resultados foram expressos em nmoles de DCF formado/mg proteína.

3.1.8. Atividade da NADPH oxidase

A atividade do complexo enzimático NADPH oxidase foi determinada, conforme descrito por Wei e colaboradores (2006), baseando-se no fato de que sua atividade é diretamente proporcional à geração, através da transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, de ânion superóxido pela enzima. Sendo assim, o consumo de NADPH foi medido em espectrofotômetro (modelo UV Visível Cary 1E, Varian, CA, EUA) a 340 nm durante 10 minutos. Os resultados foram expressos em nmoles de NADPH consumido/min/mg de proteína.

3.1.9. Níveis de lipoperoxidação

Os níveis de lipoperoxidação (LPO) foram determinados através da técnica descrita por Gonzalez-Flecha e colaboradores (1991). Para isso, as amostras foram adicionadas, na concentração de 0,5 mg/mL, em tampão fosfato 30 mM mais KCl 120 mM (pH 7,4), em vias de baixo potássio. A quimiluminescência (QL) basal desta reação

foi mensurada em um espectrômetro de cintilação líquida (1215 LKB Wallac RackBeta, Austrália). Após isto, foi adicionado hidropéroxido de tert-butil (t-BOOH) 0,5 mM nos vials contendo as amostras com o tampão e a QL iniciada por esta reação foi registrada por, no mínimo, dois ciclos completos (até atingir o pico). Os níveis de dano a lipídeos foram, então, determinados pela diferença entre a QL máxima e a QL basal. Os resultados foram expressos em cps (contagens/segundo)/mg proteína.

3.1.10. Atividade das enzimas antioxidantes

O composto químico pirogalol, quando em meio básico, sofre uma reação de auto-oxidação, gerando o ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), que por sua vez reage oxidando o próprio pirogalol. Nestas condições, a enzima SOD age inibindo a ação do ânion superóxido e, consequentemente, a oxidação do pirogalol. Baseando-se nisto, a atividade da SOD foi determinada como descrito por Marklund (1985). Foram utilizadas as seguintes soluções: solução tampão Tris-base 50 mM mais EDTA 1 mM (pH 8,2), solução de catalase 30 μM , solução de SOD (para realização da curva padrão) ou amostra analisada e pirogalol 24 mM (diluído em ácido clorídrico 10 mM). Para a realização da curva padrão, a solução de SOD (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) foi utilizada nas concentrações de 0, 0,25, 0,5 e 1 unidade. A partir da curva, foi obtido o fator de correção para calcular a conversão da porcentagem de inibição da oxidação do pirogalol, em unidades de SOD. A reação foi medida em espectrofotômetro (modelo UV Visível Cary 1E, Varian, CA, EUA) a 420 nm, e a atividade da enzima foi expressa em U/mg proteína.

Segundo Aebi (1984), a atividade da enzima CAT é diretamente proporcional à taxa de decomposição do H_2O_2 . Para determiná-la, a amostra foi adicionada a uma solução tampão de fosfatos de sódio de 50 mM (pH 7,4) mais H_2O_2 0,3 M. A reação foi medida em espectrofotômetro (modelo UV Visível Cary 1E, Varian, CA, EUA) a 240 nm e os resultados foram expressos em nmoles de H_2O_2 /min/mg proteína.

A atividade da enzima GPx foi determinada seguindo a técnica de Flohé e Günzler (1984), que se baseia na ação catalítica da enzima sobre a oxidação da GSH em GSSG. Na presença da enzima glutationa redutase (GR), que utiliza NADPH como substrato, a GSSG é convertida de volta em GSH. Nesta reação, o NADPH é oxidado a NADP^+ e a diferença de absorbâncias resultante, medida em espectrofotômetro (modelo UV Visível Cary 1E, Varian, CA, EUA) a 340 nm, é posteriormente utilizada para o cálculo da

atividade da GPx. O meio de reação foi composto por tampão fosfato de sódio 140 mM mais EDTA 1 mM (pH 7,4), NADPH 0,24 mM, azida sódica (NaN₃) 1 mM (utilizada para inibir a catalase), GSH 5 mM e GR 0,5 U/ml, e o t-BOOH 0,5 mM foi adicionado para iniciá-la. Os resultados foram expressos em pmol/min/mg proteína.

3.1.11. Antioxidantes não enzimáticos

Descrita pela primeira vez por Akerboom e Sies (1981), a determinação dos níveis de GSH e GSSG é baseada na reação das glutationas com o ácido 2-nitrobenzóico (DTNB). Para isso, é realizada a mensuração total de glutationas (TG) e de somente a GSSG, sendo a GSH determinada pela diferença entre estes dois valores. Primeiramente, as amostras foram desproteinizadas com ácido perclórico 2 M mais EDTA 2 mM e centrifugadas por 10 min a 1000 g. O sobrenadante foi, então, coletado e neutralizado com hidróxido de potássio 2 M. A amostra coletada foi dividida em dois tubos (1 para TG e 1 para GSSG) e foi adicionado N-etilmaleimida (NEM) 0,2 M, composto que inibe a GSH, apenas no tubo de medida da GSSG. O pH das amostras de ambos os tubos foi ajustado para 7,0 utilizando o composto MOPS 0,3 M mais hidróxido de potássio (KOH) 2 M. O meio de reação foi composto por água destilada, DTNB 6 mM, NADPH 0,25 mM e GR 10 U/ml. Os valores de absorvância foram medidos em espectrofotômetro (modelo UV Visível Cary 1E, Varian, CA, EUA) a 420 nm, e o resultado foi expresso como μ mol de ácido 5-tiol-2-nitrobenzoico (TNB) formado/min/mg proteína. Por fim, a razão entre as glutationas foi calculada e determinada como GSH/GSSG.

A quantificação das sulfidrilas foi realizada de acordo com Sedlak e Lindsay (1968), baseada na reação do DTNB com os grupamentos -SH. As amostras foram incubadas com DTNB 0,1 mM durante 30 min à temperatura ambiente e em ausência de luz. Os valores de absorvância foram medidos em espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200 RT, Biochrom, Reino Unido) a 412 nm, e o resultado foi expresso como nmol de TNB formado/mg proteína.

3.1.12. Atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial

As atividades da succinato desidrogenase (complexo II) e da succinato/citocromo C oxido redutase (complexo II-III)** foram medidas em meio de reação contendo a

amostra, tampão fosfato de potássio 40 mM (pH 7,4), succinato de sódio 16 mM, azida sódica 4 mM e rotenona 7 μ M. A técnica baseia-se na redução de 2,6-dinitrofenolindofenol (DNP⁺) 8,3 μ M pelo complexo II através da adição deste composto no momento da leitura, realizada em espectrofotômetro a 600 nm e da redução do citocromo C 50 μ M pelo caminho dos complexos II-III, realizada a 550 nm. A atividade da citocromo C oxidase (complexo IV)** foi medida em meio de reação contendo a amostra, tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e dodecil maltosídeo (DDM) 0,6 mM. A leitura foi realizada seguindo a oxidação, pelo complexo IV, do citocromo C 75 μ M adicionado no momento da leitura em espectrofotômetro a 550 nm. Os resultados foram expressos como nmol/min/mg de proteína.

3.1.13. Atividade da enzima citrato sintase

A atividade da citrato sintase** foi determinada de acordo com a técnica descrita por Shepherd e Garland (1969), a qual se baseia no fato de que a redução do DTNB a TNB é diretamente proporcional à atividade da enzima. O meio de reação consistiu na amostra adicionada em tampão fosfato de potássio 5 mM (pH 7,4), sacarose 300 mM, EGTA 1 mM, BSA 0,1%, MOPS 5 mM, Triton X-100 0,1%, DTNB 0,1 mM, acetil-CoA 0,1 mM e oxaloacetato 0,2 mM e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 412 nm. Os resultados são expressos como μ mol de TNB formado/min/mg de proteína.

** análises realizadas no laboratório de pesquisa do Dr. Guilhian Leipnitz, com auxílio da Dra. Belisa Parmeggiani e do Dr. Mateus Grings, no Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, Brasil).

3.1.14. Atividade das enzimas da via da pentose fosfato

As atividades da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e da 6-fosfogluconato desidrogenase (6PDG) foram determinadas de acordo com Leong e Clark (1984), baseando-se na formação diretamente proporcional à atividade das enzimas de NADPH. O meio de reação consistiu na amostra adicionada em tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,5),

cloreto de magnésio (MgCl_2) 1,0 mM, NADP^+ 0,05 mM e glicose-6-fosfato 0,1 mM. A formação de NADPH foi mensurada em espectrofotômetro a 340 nm. Os resultados são expressos em U de NADPH formado/mg de proteína.

3.2. *Experimento II*

Este experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular e Saúde Global coordenado pelo Dr. Ruhul Abid, no Centro de Pesquisa Cardiovascular, Divisão de Cirurgia Cardiorácica, Departamento de Cirurgia, Hospital de Rhode Island e Escola de Medicina Warren Alpert da Brown University (Providence, RI, EUA).

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Uso e Cuidado de Animais Institucionais (IACUC) no Hospital de Rhode Island (Lifespan Animal Care, número do protocolo: 5019-19) e foram realizados de acordo com as diretrizes do NIH (National Institute of Health, Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório).

3.2.1. *Animais*

Foram utilizados 36 camundongos da raça FVB de ambos os sexos (50-60% machos e 40-50% fêmeas por grupo) de seis semanas de idade, pesando, aproximadamente, 20g. Todos os animais foram tratados em coordenação com os técnicos veterinários do Hospital de Rhode Island, alojados em gaiolas no biotério e mantidos em condições padrão (ciclo claro/escuro de 12h, 21°C e umidade controlada de 55%) com livre acesso à ração e água.

3.2.2. *Cultura das células mesenquimais e isolamento das MSC-EVs*

Células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea humana (hBM-MSCs; Lonza, Basel, Suíça) foram cultivadas em meio de cultura com alta concentração de glicose (Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM; Gibco, Waltham, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Gibco, Waltham, EUA) e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco, Waltham, EUA) em uma incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO_2 . Quando as células atingiram 80% de confluência na passagem 7, o

DMEM foi substituído por meio de cultura sem soro (Roswell Park Memorial Institute 1640 - RPMI 1640; Thermo Fisher, Waltham, EUA) [Aliotta et al., 2016]. Após 24h, o meio de cultura foi coletado e centrifugado por 30 min a 2.000 x g e 4°C (2x), para remover resíduos celulares. O sobrenadante foi transferido para tubos de polipropileno estéreis de parede fina para ser ultra-centrifugado por 70 min a 100.000 x g e 4°C (2x). O pellet final foi, então, ressuspensionado em PBS 1x estéril suplementado com 1% de dimetilsulfóxido (DMSO), rapidamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até o tratamento [Scrimgeour et al., 2019; Théry et al., 2006].

3.2.3. *Caracterização das MSC-EVs*

A distribuição de tamanho e a concentração das MSC-EVs foram determinadas por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) usando NanoSight 5000 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) conforme descrito anteriormente [Théry et al., 2006; Wen et al., 2016]. As MSC-EVs também foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) conforme descrito anteriormente [Wen et al., 2019], onde um volume igual de paraformaldeído a 4% foi usado para fixar as vesículas, que foram, então, colocados em grades revestidas de carbono. As grades foram lavadas com PBS 1x e as MSC-EVs fixadas em glutaraldeído 1% e acetato de uranila 4%, para contraste. As MSC-EVs fixadas nas grades foram observadas usando um microscópio eletrônico de transmissão Phillips 410 (Phillips, Eindhoven, Holanda) e o software de imagem AMT foi usado para adquirir as imagens. Finalmente, o marcador de vesículas extracelulares CD63 (anti-CD63 antibody, Cell Signaling Technology, EUA) foi avaliado por western blot [Théry et al., 2006].

3.2.4. *Protocolo experimental*

Os animais foram divididos, de forma randômica, em quatro grupos experimentais: Controle (n=8), MCT (n=11), Controle + EVs (n=7) e MCT + EVs (n=10). No dia anterior à primeira série de injeções, os animais foram pesados e o ecocardiograma basal foi realizado. Para induzir a hipertensão arterial pulmonar, os camundongos nos grupos MCT e MCT + EVs receberam injeções subcutâneas semanais de monocrotalina na dose de 60mg/kg (MCT; Sigma, St. Louis, MO, EUA) durante 4 semanas, em um

volume final de 100 µl de PBS 1x estéril. Os animais dos grupos Controle e Controle + EVs foram tratados de forma equivalente apenas com veículo. A MCT foi preparada de acordo com as instruções do fabricante; o pó foi diluído em HCl 1M e neutralizado com NaOH 1M até pH 7,4.

Vinte e quatro horas após cada injeção de MCT, os camundongos foram anestesiados com 2% de isoflurano (vaporizador VetFlo™, Kent Scientific Corp., CT, EUA) e 3×10^6 partículas de MSC-EVs diluídas em PBS 1x estéril até o volume final de 100 µl [Aliotta et al., 2016] foram injetadas por via intravenosa através da veia caudal dos camundongos dos grupos Controle + EVs e MCT + EVs, enquanto os camundongos dos grupos Controle e MCT foram tratados de forma equivalente apenas com veículo. O esquema do protocolo realizado pode ser visualizado na figura 4.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Experimento II - Avaliação do tratamento com vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais em camundongos com hipertensão arterial pulmonar

GRUPOS EXPERIMENTAIS:



Controle, n=8
Injeção subcutânea de veículo - 4x;
Injeção intravenosa de veículo - 4x;



Monocrotalina, n=12
Injeção subcutânea de MCT (60 mg/kg) - 4x;
Injeção intravenosa de veículo - 4x;



Controle + EVs, n=7
Injeção subcutânea de veículo - 4x;
Injeção intravenosa de MSC-EVs (3 x 10⁶) - 4x;



Monocrotalina + EVs, n=10
Injeção subcutânea de MCT (60 mg/kg) - 4x;
Injeção intravenosa de MSC-EVs (3 x 10⁶) - 4x;

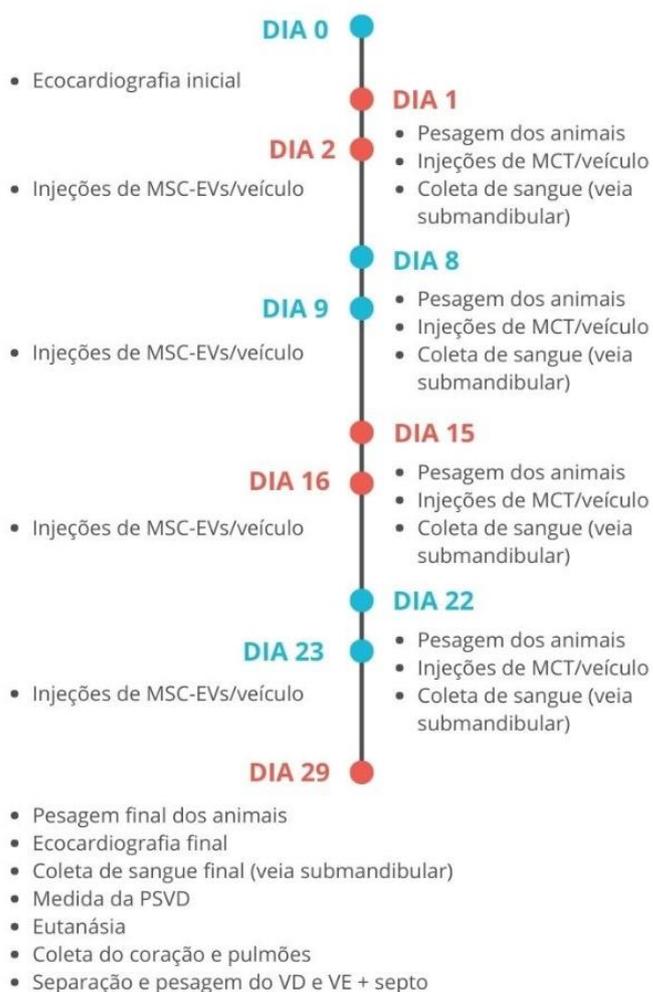


Figura 7. Protocolo experimental do Experimento II.

3.2.5. *Análises ecocardiográficas*

Os animais foram anestesiados com 2–3% de isoflurano (vaporizador VetFlo™, Kent Scientific Corp., CT, EUA), colocados em posição supina em uma estação de imagem aquecida a 37°C (FUJIFILM VisualSonics Inc, ON, Canadá) e o tórax foi tricotomizado. Foram utilizadas as visões de eixo longo e curto, e visão apical das 4 câmaras nos modos bidimensional, M, AM e Doppler pulsado, para a obtenção das imagens, utilizando o sistema de ultrassom Vevo 2100 (FUJIFILM VisualSonics Inc., Canadá) e transdutor MS-550D. Estas imagens foram utilizadas para avaliar o RVP, através da análise dos parâmetros de tempo de aceleração da artéria pulmonar (AT), tempo de ejeção da artéria pulmonar (ET) e razão AT/ET, medidas através da avaliação da saída do fluxo pelo vaso, e a função sistólica do VD, através da análise da excursão sistólica do plano anular tricúspide (TAPSE) [Brittain et al., 2013].

3.2.6. *Análise da pressão sistólica do ventrículo direito*

Para avaliação da pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD), os camundongos foram anestesiados com 2-3% de isoflurano (vaporizador VetFlo™, Kent Scientific Corp., CT, EUA) e um cateter de pressão (Millar Mikro-Tip®, EUA) foi inserido abaixo do processo xifóide em direção ao VD. Antes da inserção, o transdutor foi definido como zero no nível médio do tórax e calibrado para 100 mmHg. A PSVD foi, então, registrada com o hardware de monitoramento PowerLab e software LabChart (AD Instruments Inc. Colorado Springs, EUA) por 1 minuto e o valor foi verificado a partir de uma sequência de pelo menos 10 ondas estáveis [Vitali et al., 2009].

3.2.7. *Índice de hipertrofia do ventrículo direito*

Para avaliar o índice de hipertrofia ventricular direita, o VD foi separado do VE e do septo interventricular (S), logo após a eutanásia, e os tecidos foram pesados. Os valores de hipertrofia foram obtidos utilizando o índice de Fulton, determinado pela fórmula: massa VD/(VE + S) [Fulton et al., 1952].

3.2.8. *Análise do remodelamento vascular pulmonar*

Os pulmões foram coletados no momento da eutanásia e imediatamente imersos em paraformaldeído 4%. Para a realização da histologia pulmonar, o tecido foi incluído em parafina e a coloração com hematoxilina e eosina foi realizada em cortes de 5 µm de cada bloco de parafina. Os pulmões de cinco animais de cada grupo experimental foram preparados e quatro vasos foram analisados de cada camundongo (totalizando 20 vasos em cada grupo). A espessura da parede do vaso (distância a partir da lâmina interna até a camada adventícia) e o diâmetro intraluminal foram medidos. A relação entre a espessura da parede do vaso pulmonar e o diâmetro do vaso (WT/D) foi, então, avaliada para a determinação do índice de remodelamento vascular pulmonar [Aliotta et al., 2016]. As análises foram realizadas com cegamento do pesquisador, sem que o mesmo tomasse conhecimento sobre qual grupo experimental cada lâmina pertencia.

3.2.9. *Isolamento e caracterização das EVs derivadas do soro dos animais*

Aproximadamente 100 µl de sangue foram coletados de cada animal, por semana, a partir da veia submandibular (veia da bochecha), com uma lanceta de uso único estéril (Goldenrod 5,0 mm, Braintree Scientific, Inc., EUA). As amostras de sangue foram centrifugadas por 15 min a 3000 x g e 4°C (2x) e o sobrenadante, composto do soro sanguíneo, foi coletado. As EVs foram purificadas pelo Total Exosome Isolation Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. A presença das EVs nas amostras foi caracterizada por NTA, utilizando a NanoSight 5000 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) e pela análise da expressão da CD63 (anti-CD63 antibody, Cell Signaling Technology, EUA). A quantificação de proteína foi medida usando Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA) e as amostras foram preparadas para western blot.

3.2.10. *Western blot*

As amostras foram pipetadas em gel de corrida (12-16% NuPage Bis-Tris Mini Gel, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EUA) e tampão de eletroforese MOPS (NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EUA)

1x. Após isto, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore, Billerica, EUA), mergulhada em tampão de transferência (NuPAGE™ Transfer Buffer, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EUA) 1x e metanol 10%, durante 14h em sala fria a 4°C. As membranas foram, então, bloqueadas com 5% de leite diluído em TBST 0,1% (Pierce™ 20X TBS Tween™ 20 Buffer, Thermo Fisher Scientific, EUA) em temperatura ambiente, por 1h. As membranas foram lavadas com TBST (3x de 10 min) e incubadas com anticorpos primários anti-CD63 (1:1000; 25-60 kDa), anti-CPT1A (1:1000; 88 kDa), anti-phospho-GSK3β (1:1000; 46 kDa), anti-phospho-FOXO1 e anti-total-FOXO1 (1:1000; 78-82 kDa), MnSOD (1:1000; 22 kDa) e SIRT1 (1:1000; 120 kDa) (Cell Signaling Technology, EUA) por 16h, em sala fria a 4°C. Em seguida, os anticorpos primários foram removidos, as membranas foram lavadas com TBST (3x de 10 min) e incubadas com os anticorpos secundários (1: 5000; anti-mouse e anti-rabbit) por 2h, em temperatura ambiente. Por fim, foi utilizado o Western Blotting ECL (SuperSignal™ Western Blot Enhancer, Thermo Fisher Scientific, EUA) para detecção de proteínas, e as proteínas foram visualizadas por quimiluminescência, detectadas em um sistema ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, EUA). A expressão proteica foi quantificada utilizando o software ImageJ (Wayne Rasband, Research Services Branch, NIH, EUA) e os resultados foram normalizados por α -tubulina (1:1000; 45 kDa).

3.3. Experimento III

Este experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular e Saúde Global coordenado pelo Dr. Ruhul Abid, no Centro de Pesquisa Cardiovascular, Divisão de Cirurgia Cardiorácica, Departamento de Cirurgia, Hospital de Rhode Island e Escola de Medicina Warren Alpert da Brown University (Providence, RI, EUA).

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Uso e Cuidado de Animais Institucionais (IACUC) no Hospital de Rhode Island (Lifespan Animal Care, número do protocolo: 5019-19) e foram realizados de acordo com as diretrizes do NIH (Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório).

3.3.1. Animais

Foram utilizados 14 camundongos FVB transgênicos de ambos os sexos (50-60% machos e 40-50% fêmeas por grupo) de seis semanas de idade, pesando, aproximadamente, 20g. Todos os animais foram tratados em coordenação com os técnicos veterinários do Hospital de Rhode Island, alojados em gaiolas no biotério e mantidos em condições padrão (ciclo claro/escuro de 12h, 21°C e umidade controlada de 55%) com livre acesso à ração e água.

Os camundongos utilizados neste experimento são animais (DADOS NÃO PUBLICADOS), que apresentam superexpressão condicional (OE) da MnSOD (isoforma mitocondrial) especificamente em células endoteliais.

(A DESCRIÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA NESTE MODELO EXPERIMENTAL AINDA NÃO FOI PUBLICADA E ESTES DADOS PERMANECERÃO EM SIGILO ATÉ A DATA DE SUA PUBLICAÇÃO EM FORMATO DE ARTIGO)

(DADOS NÃO PUBLICADOS)

Figura 8. Modelo transgênico de superexpressão da MnSOD em células endoteliais.

3.3.2. *Protocolo experimental*

Os animais foram divididos, de forma randômica, em dois grupos experimentais: MnSODVE-NE (n=7) e MnSODVE-OE (n=7). No dia anterior à primeira série de injeções, os animais foram pesados e o ecocardiograma basal foi realizado. Para induzir a hipertensão arterial pulmonar, os camundongos de ambos os grupos receberam injeções subcutâneas semanais de monocrotalina na dose de 60mg/kg (MCT; Sigma, St. Louis, MO, EUA) durante 4 semanas, em um volume final de 100 µl de PBS 1x estéril. A MCT foi preparada de acordo com as instruções do fabricante; o pó foi diluído em HCl 1M e neutralizado com NaOH 1M até pH 7,4.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Experimento III - Avaliação do efeito da superexpressão da MnSOD em camundongos transgênicos com hipertensão arterial pulmonar

GRUPOS EXPERIMENTAIS:



MnSODVE-NE (Tet-ON, expressão normal de MnSOD), n=7

Injeção subcutânea de MCT (60 mg/kg) - 4x;



MnSODVE-OE (Tet-OFF, superexpressão de MnSOD), n=7

Injeção subcutânea de MCT (60 mg/kg) - 4x;

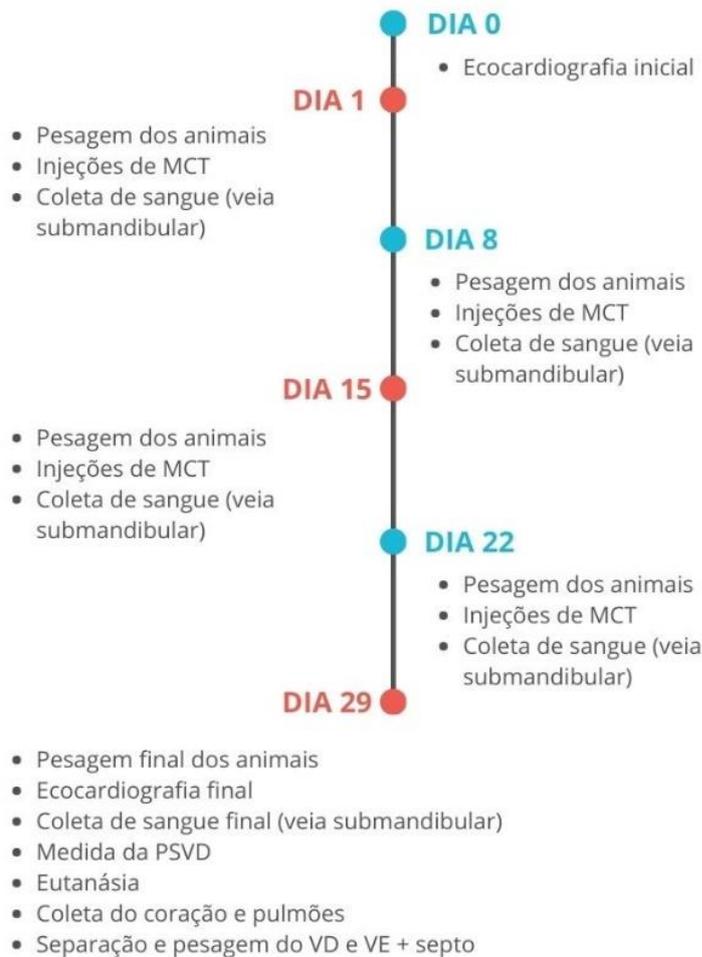


Figura 9. Protocolo experimental do Experimento III.

3.3.3. *Análises ecocardiográficas*

Estas análises foram realizadas de acordo com o método descrito no item 3.2.5.

3.3.4. *Análise da pressão sistólica do ventrículo direito*

Estas análises foram realizadas de acordo com o método descrito no item 3.2.6.

3.3.5. *Índice de hipertrofia do ventrículo direito*

Estas análises foram realizadas de acordo com o método descrito no item 3.2.7.

3.3.6. *Análise do remodelamento vascular pulmonar*

Estas análises foram realizadas de acordo com o método descrito no item 3.2.8.

3.3.7. *Western blot*

Estas análises foram realizadas de acordo com o método descrito no item 3.2.10. Os resultados foram normalizados pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (1:1000; 37 kDa).

3.4. *Análises estatísticas*

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para determinar a normalidade de distribuição dos dados. Os dados dos Experimentos I e III foram analisados pelo teste t de Student para amostras desemparelhadas, e as correlações foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Pearson. Os dados do Experimento II foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Tukey. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e as análises que apresentaram $P < 0,05$ foram aceitas como estatisticamente

significativas. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 8.

4. Resultados

4.1. *Experimento I*: artigo “Pulmonary arterial hypertension induces the release of circulating extracellular vesicles with oxidative content and alters redox and mitochondrial homeostasis in the brain of rats”

O artigo com os resultados do experimento I foram publicados na revista Hypertension Research. Esta é a versão aceita pela revista para arquivamento. Para acesso na íntegra ao artigo, por favor acesse: <https://www.nature.com/articles/s41440-021-00660-y#Abs1>
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41440-021-00660-y>

Article | Published: 19 April 2021

Pulmonary arterial hypertension induces the release of circulating extracellular vesicles with oxidative content and alters redox and mitochondrial homeostasis in the brains of rats

Giana Blume Corssac, Jéssica Poletto Bonetto, Cristina Campos-Carraro, Laura Reck Cechinel, Alexandra Zimmer, Belisa Parmeggiani, Mateus Grings, Virgínia Mendes Carregal, André Ricardo Massensini, Ionara Siqueira, Guilhian Leipnitz & Adriane Belló-Klein 

Hypertension Research **44**, 918–931 (2021)

257 Accesses | 4 Citations | 5 Altmetric | Metrics

Abstract

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by increased resistance of the pulmonary vasculature and afterload imposed on the right ventricle (RV). Two major contributors to the worsening of this disease are oxidative stress and mitochondrial impairment. This study aimed to explore the effects of monocrotaline (MCT)-induced PAH on redox and mitochondrial homeostasis in the RV and brain and how circulating extracellular vesicle (EV) signaling is related to these phenomena. Wistar rats were divided into control and MCT groups (60 mg/kg, intraperitoneal), and EVs were isolated from blood on the day of euthanasia (21 days after MCT injections). There was an oxidative imbalance in the RV, brain, and EVs of MCT rats. PAH impaired mitochondrial function in the RV, as seen by a decrease in the activities of mitochondrial complex II and citrate synthase and manganese superoxide dismutase (MnSOD) protein expression, but

this function was preserved in the brain. The key regulators of mitochondrial biogenesis, namely, proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha and sirtuin 1, were poorly expressed in the EVs of MCT rats, and this result was positively correlated with MnSOD expression in the RV and negatively correlated with MnSOD expression in the brain. Based on these findings, we can conclude that the RV is severely impacted by the development of PAH, but this pathological injury may signal the release of circulating EVs that communicate with different organs, such as the brain, helping to prevent further damage through the upregulation of proteins involved in redox and mitochondrial function.

This is a preview of subscription content

Acknowledgements

This work was supported by research grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We thank Tânia Regina Fernandes Piedras for all technical assistance during the development of this research.

<https://www.nature.com/articles/s41440-021-00660-y#Abs1>

14/17

Author information

Affiliations

Postgraduate Program in Biological Sciences: Physiology, Department of Physiology, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Giana Blume Coessac, Jéssica Poletto Bonetto, Cristina Campos-Carraro, Laura Reck Cechinel, Alexandra Zimmer, Ionara Siqueira, Guilhian Leipnitz & Adriane Belló-Klein

Postgraduate Program in Biological Sciences: Pharmacology and Therapeutic, Department of Pharmacology, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Laura Reck Cechinel & Ionara Siqueira

Postgraduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Department of Biochemistry, Institute of Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Belisa Parmeggiani, Mateus Grings & Guilhian Leipnitz

Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil
Virginia Mendes Carregal & André Ricardo Massensini

Corresponding author

Correspondence to [Adriane Belló-Klein](#).

Ethics declarations

Conflict of interest

The authors declare no competing interests.

Additional information

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Rights and permissions

[Reprints and Permissions](#)

<https://www.nature.com/articles/s41440-021-00660-y#Abs1>

15/17

29/04/2022 12:03 Pulmonary arterial hypertension induces the release of circulating extracellular vesicles with oxidative content and alters redox an...

About this article

Cite this article

Corssac, G.B., Bonetto, J.P., Campos-Carraro, C. *et al.* Pulmonary arterial hypertension induces the release of circulating extracellular vesicles with oxidative content and alters redox and mitochondrial homeostasis in the brains of rats. *Hypertens Res* **44**, 918–931 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41440-021-00660-y>

Received

03 December 2020

Revised

09 March 2021

Accepted

14 March 2021

Published

19 April 2021

Issue Date

August 2021

DOI

<https://doi.org/10.1038/s41440-021-00660-y>

Keywords

Extracellular vesicles • Mitochondrial function • Monocrotaline • Oxidative stress • Pulmonary hypertension

4.2. Experimento II: artigo “Therapeutic effects of extracellular vesicles derived from mesenchymal stromal cells in pulmonary arterial hypertension”

(OS RESULTADOS OBTIDOS NO EXPERIMENTO II AINDA NÃO FORAM PUBLICADOS E ESTES DADOS PERMANECERÃO EM SIGILO ATÉ A DATA DE SUA PUBLICAÇÃO EM FORMATO DE ARTIGO)

4.3. Experimento III: artigo “Therapeutic effects of MnSOD overexpression in pulmonary arterial hypertension”

(OS RESULTADOS OBTIDOS NO EXPERIMENTO III AINDA NÃO FORAM PUBLICADOS E ESTES DADOS PERMANECERÃO EM SIGILO ATÉ A DATA DE SUA PUBLICAÇÃO EM FORMATO DE ARTIGO)

5. Discussão

A indução da HAP, realizada através do modelo experimental da MCT, foi bem-sucedida em ambos os protocolos experimentais de ratos (experimento I) e camundongos (experimentos II e III), fato evidenciado pelas alterações morfológicas, hemodinâmicas e funcionais, características da doença, encontradas nos animais dos grupos “MCT”. No experimento I, a utilização da MCT para induzir a HAP em ratos está bem descrita na literatura, bastando apenas uma única dose deste fármaco para causar os eventos responsáveis pelo estabelecimento da doença nestes animais. De fato, apenas 21 dias foram suficientes para induzir uma forma grave da HAP em ratos, com uma taxa de mortalidade de 27% neste trabalho (dados não mostrados). Dos animais que sobreviveram, todos apresentaram baixo peso corporal e aumento da PSVD, da mPAP, da hipertrofia do VD e da congestão pulmonar, sinais clássicos da HAP.

Nos experimentos II e III, camundongos da raça FVB foram utilizados. Apesar de ratos e camundongos serem roedores com muitas características em comum, a MCT não exerce o mesmo efeito em ambos, uma vez que os camundongos são muito mais resistentes aos efeitos citotóxicos deste fármaco. Isso se deve às diferenças de

metabolismo entre estas espécies, principalmente no metabolismo hepático mediado pelo citocromo P-450, um complexo enzimático essencial para a bioativação da MCT no organismo [He et al., 2021]. Entretanto, mesmo dentro da espécie dos camundongos há diferenças entre as linhagens, nas quais algumas são mais suscetíveis a determinadas doenças que outras. A linhagem FVB de camundongos, utilizados neste trabalho, é particularmente suscetível a doenças como asma e nefropatia diabética e, além disso, é considerada ideal para criação de modelos transgênicos [Chen et al., 2018]. No entanto, poucos estudos utilizaram os camundongos FVB em modelo de HAP, nenhum deles utilizando a MCT como agente indutor. Neste trabalho, uma vez que o modelo de superexpressão da MnSOD (experimento III) utiliza camundongos FVB transgênicos, optamos por utilizá-los também no experimento II, a fim de comparação entre o tipo selvagem e o tipo transgênico. De fato, neste protocolo experimental, alguns animais parecem não ter desenvolvido a doença na mesma gravidade que outros, como pode-se observar pelo grande desvio padrão nos valores de PSVD entre animais dos grupos “MCT”. De forma geral, entretanto, os parâmetros ecocardiográficos, histológicos e morfométricos analisados permitiram caracterizar bem a HAP nos grupos MCT não-tratados, mostrando que a indução da doença foi bem-sucedida na maioria dos animais destes grupos. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que relata o desenvolvimento de HAP em camundongos FVB utilizando o modelo da MCT.

Para facilitar a discussão deste trabalho, um panorama geral dos resultados encontrados está resumido na figura 22 abaixo.

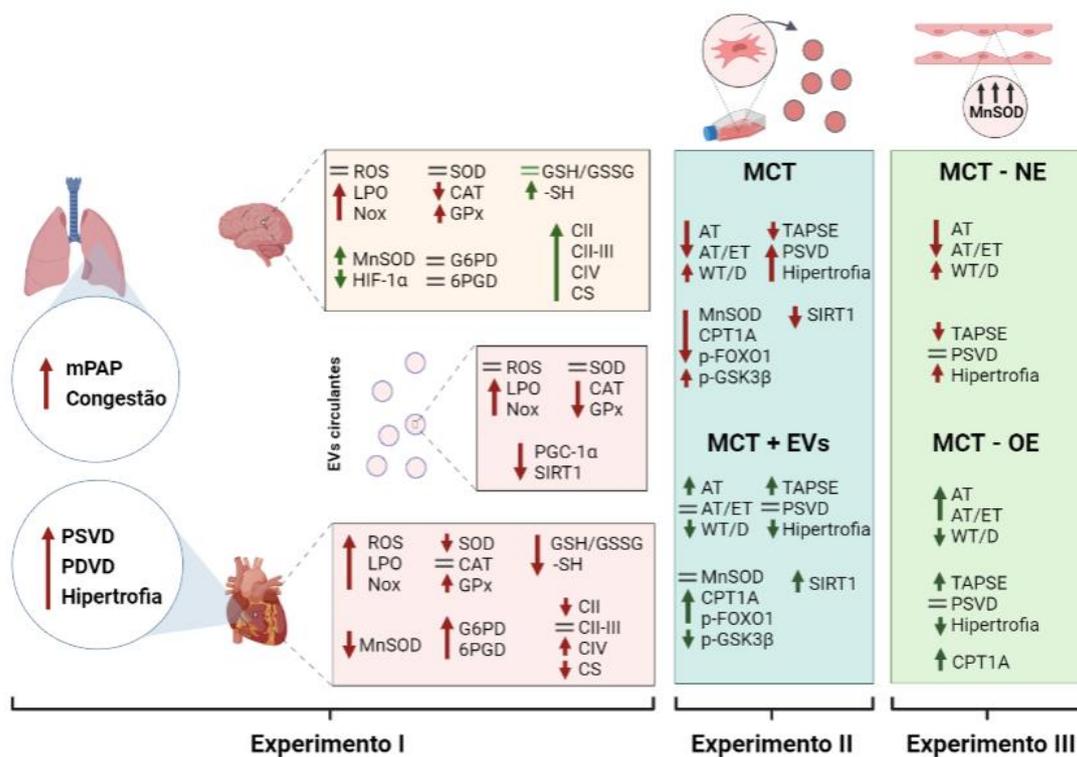


Figura 22. Panorama geral dos resultados apresentados neste trabalho. 6PGD, 6-fosfogluconato desidrogenase; AT, tempo de aceleração da artéria pulmonar; CII, CII-III e CIV, complexos II, II-III e IV da cadeia de transporte de elétrons; CAT, catalase; CPT1A, Isoforma A da enzima carnitina palmitoiltransferase-1; ET, tempo de ejeção da artéria pulmonar; G6PD, glicose-6-fosfato desidrogenase; GPx, glutatona peroxidase; GSH, glutatona reduzida; GSSG, glutatona oxidada; HIF-1 α , fator 1-alfa induzido por hipóxia; LPO, lipoperoxidação; MCT, monocrotalina; MnSOD, manganês superóxido dismutase; mPAP, pressão média da artéria pulmonar; Nox, NADPH oxidases; NE, expressão normal; OE, superexpressão; PGC-1 α , coativador 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissomo; PDVD, pressão diastólica do ventrículo direito; PSVD, pressão sistólica do ventrículo direito; p-FOXO1, proteína O da família Forkhead fosforilada; p-GSK3 β , glicogênio sintase quinase 3 β fosforilada; ROS, espécies reativas de oxigênio; -SH, sulfidrilas; SIRT1, sirtuina 1; SOD, superóxido dismutase; TAPSE, excursão sistólica do plano anular tricúspide; WT/D, espessura da parede do vaso pulmonar dividido pelo diâmetro do vaso. Criada em BioRender.com.

Primeiramente, foi possível confirmar que os danos causados pela HAP na função cardíaca direita estão relacionados com o desequilíbrio da homeostase redox e mitocondrial no VD. Neste tecido, foi observado o estabelecimento de um ambiente redox mais oxidativo, uma vez que há um aumento da geração de ROS e uma diminuição tanto

na expressão da MnSOD, quanto na atividade da SOD em geral. Este desequilíbrio fica ainda mais evidenciado pela diminuição da razão entre as glutathionas reduzida e oxidada (GSH/GSSG), um dos principais indicadores do estado redox celular. Por si só, o aumento do estresse oxidativo está relacionado com o dano inicial às células endoteliais e musculares lisas que levam ao remodelamento vascular pulmonar e aumento da RVP na HAP [Rafikova et al., 2019]. Nesse contexto, o aumento da pós-carga leva ao aumento da hipertrofia do VD, e estas alterações promovem ainda mais aumento do estresse oxidativo neste tecido, que induz a resposta inflamatória e promove fibrose, contribuindo para a piora na função cardíaca direita e consequente insuficiência do VD [Mikhael et al., 2019]. Neste cenário, a disfunção mitocondrial é um dos principais mecanismos que contribuem para o aumento dos níveis de ROS, que por sua vez promovem oxidação de proteínas envolvidas no metabolismo mitocondrial e facilitam a abertura de poros de transição de permeabilidade que causam desequilíbrio iônico nesta organela [Ten and Ratner, 2020]. Há, portanto, uma relação recíproca entre a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo. Neste trabalho, o aumento do estresse oxidativo no VD foi acompanhado pela perturbação na atividade dos complexos da cadeia respiratória de elétrons e da enzima citrato sintase, além da diminuição na expressão da MnSOD, enzima antioxidante que atua na primeira linha de defesa contra as ROS geradas na mitocôndria [Peoples et al., 2019]. Além disso, o prejuízo na atividade e no metabolismo energético mitocondrial está diretamente relacionado com a disfunção do VD e o desenvolvimento da HAP [Ryan et al., 2015]. Tanto nas células da vasculatura pulmonar como no VD, a reprogramação metabólica descrita no efeito Warburg promove o aumento da geração de ATP pela via glicolítica, inibindo a atividade mitocondrial. Uma das consequências do aumento da glicólise é o aumento da atividade da PPP, para promover a síntese de macromoléculas e, assim, a proliferação celular [Hidalgo et al., 2022]. No presente estudo, o aumento das atividades das enzimas G6PD e 6PGD permitem concluir que a via glicolítica está mais ativada no VD dos animais com HAP induzida por MCT, corroborando os resultados anteriores de que o ambiente celular mais oxidativo, a disfunção mitocondrial e o prejuízo no metabolismo energético são proeminentes nesta doença.

Alguns estudos observaram que um estímulo estressor sobre uma célula faz com que a mesma libere maiores quantidades de EVs. Neste caso, não apenas a quantidade, mas, também, a composição e a carga das EVs liberadas poderiam ser diferentes [Chen et al., 2021; Quesenberry et al., 2014; Théry et al., 2006]. No presente trabalho, embora

não tenha havido um aumento na quantidade de EVs derivadas do soro do animais com HAP induzida por MCT, estas partículas apresentaram características semelhantes às encontradas no VD, evidenciado pelo aumento da LPO e da atividade da Nox, diminuição da atividade das enzimas antioxidantes e, além disso, diminuição nos níveis de PGC-1 α e SIRT1, proteínas relacionadas ao bom funcionamento da dinâmica mitocondrial. Sendo assim, apesar de não terem sido realizados experimentos que de fato confirmem a procedência destas EVs, podemos considerar que os tecidos mais afetados pela doença, ou seja, os pulmões e o VD, provavelmente foram responsáveis pela maior liberação de vesículas com padrão de disfunção redox e mitocondrial características da HAP. Uma vez liberadas na circulação sanguínea, as EVs atuam como veículos de comunicação entre diferentes órgãos do corpo. No cérebro, esta comunicação parece servir como um alerta de que há um processo patológico ocorrendo, fazendo com que as células promovam uma resposta de adaptação a um possível dano redox e mitocondrial neste tecido.

Baseando-se nesta ideia de que as EVs circulantes se comportam como comunicadoras intercelulares mediando respostas adaptativas contra o dano celular causado por uma doença metabólica como a HAP, nosso segundo objetivo foi analisar se as EVs derivadas de MSCs poderiam prevenir o desenvolvimento da HAP através da promoção de uma resposta adaptativa metabólica das células pulmonares. Neste caso, o tratamento com as MSC-EVs foi eficaz em impedir o remodelamento vascular pulmonar e, conseqüentemente, o aumento da RVP. Além disso, não foi observado aumento da hipertrofia no VD, preservando a anatomia desta câmara cardíaca. O efeito protetor das MSC-EVs contra a HAP não é uma novidade e já foi observado em diversos estudos publicados na última década. No estudo de Chen e colaboradores (2014), as MSC-EVs melhoraram a mPAP, o remodelamento vascular pulmonar e a hipertrofia do VD de ratos com HAP induzida por MCT, de forma semelhante ao tratamento apenas com as MSCs. Esta comparação foi importante para determinar uma abordagem terapêutica livre de células [Chen et al., 2014]. A melhora destes parâmetros morfológicos promovida pelas MSC-EVs em animais com HAP também já foi observada em diversos estudos do grupo de pesquisa em hematologia e oncologia da Universidade Brown/Hospital de Rhode Island (Estados Unidos), e esse efeito positivo foi associado com a expressão de miRs envolvidos na atividade antiproliferativa de células vasculares e com a diminuição do recrutamento de macrófagos para o pulmão [Aliotta et al., 2016, 2017; Klinger et al., 2020b]. Já no estudo de Hogan e colaboradores (2019), estes mesmos efeitos positivos foram observados, mas, neste caso, foram associados com a melhora da função

mitocondrial e reversão da disfunção metabólica associada ao efeito Warburg [Hogan et al., 2019]. Sendo assim, o efeito benéfico das MSC-EVs já foi comprovado dentro da pesquisa experimental, mas, apesar de não haver dúvida do papel destas vesículas sobre o remodelamento vascular pulmonar, a hipertrofia e a pressão do VD, uma contribuição do presente trabalho é corroborar ainda mais estes achados através da análise sobre o fluxo da artéria pulmonar e a função do VD, medidos pela ecocardiografia. Até o momento, não há na literatura um estudo avaliando o tratamento com MSC-EVs sobre parâmetros ecocardiográficos. Neste trabalho, estas análises foram realizadas e foi observado que o tratamento preveniu a diminuição do AT, ET e TAPSE, preservando o fluxo pela artéria pulmonar e a função cardíaca direita, e impedindo que a HAP se desenvolvesse nestes animais.

Para compreender quais vias de sinalização estão envolvidas no efeito protetor das MSC-EVs, a expressão de algumas proteínas foi analisada no tecido pulmonar dos animais. Os resultados observados indicam que o mecanismo de ação deste tratamento está relacionado com o metabolismo mitocondrial energético das células pulmonares. Na literatura, apenas o estudo de Hogan e colaboradores (2019) relacionou as MSC-EVs na HAP com a melhora do metabolismo energético e do efeito Warburg, mas este efeito foi específico nas células musculares lisas da artéria pulmonar [Hogan et al., 2019]. Sendo assim, ainda há pouco material de estudo para entender com clareza como o tratamento com as MSC-EVs afeta esta via metabólica. No experimento II do presente trabalho, a expressão da MnSOD estava diminuída no pulmão dos animais com HAP induzida por MCT, resultado similar ao encontrado no VD dos animais MCT do experimento I. O tratamento não aumentou os níveis da enzima em relação ao grupo doente, mas, também, não foi diferente do grupo controle. Neste caso, um número maior de amostras em cada grupo aumentaria o poder estatístico desta comparação e, possivelmente, mostraria um aumento significativo no grupo MCT + EVs em relação ao grupo MCT.

A GSK-3 β tem papel crucial no remodelamento vascular pulmonar [Sklepkiwicz et al., 2011] e alguns estudos observaram que sua forma fosforilada, ou seja, sua forma inativada (p-GSK-3 β), está mais expressa em animais com HAP, tanto no VD [Colombo et al., 2013] quanto em PSMCs [Li et al., 2020]. No presente estudo, este aumento não foi observado no homogeneizado de tecido pulmonar dos animais doentes, mas o tratamento diminuiu a expressão da p-GSK-3 β em relação ao grupo MCT. Além da sua função sobre o remodelamento e proliferação das células da vasculatura pulmonar, esta proteína participa da regulação do transportador de glicose 1 (GLUT1) em diversas

células [Kraus et al., 2016]. O aumento da expressão do GLUT1 está diretamente relacionado com o estabelecimento do efeito Warburg, estando implicado tanto em células cancerosas [Kraus et al., 2016], como em células endoteliais na HAP [Smolders et al., 2022]. Da mesma forma, a FOXO1 fosforilada, ou seja, sua forma inativada (p-FOXO1) está mais expressa em VD de ratos e humanos com HAP. Quando ativada, esta proteína promove o aumento da atividade da PDK, estimulando a inibição da PDH. [Piao et al., 2013]. Sendo assim, a regulação da ativação/inativação de ambas as proteínas GSK-3 β e FOXO1 estimulada pelas MSC-EVs parece evitar a reprogramação metabólica característica do efeito Warburg.

Considerando os resultados de expressão proteica descritos acima, o tratamento com as MSC-EVs parece estar envolvido com a regulação do metabolismo energético de forma inespecífica nas células do tecido pulmonar, abrangendo todo o parênquima deste órgão. O efeito da doença, entretanto, pode ser mais específico de cada tipo celular, uma vez que, neste tecido, as mudanças de fenótipo causadas pela HAP são, principalmente, sobre as células musculares lisas e as células endoteliais. Nesse sentido, uma proteína envolvida com a regulação de diversas vias importantes para a patofisiologia da HAP é a SIRT1. A SIRT1 está implicada tanto no metabolismo e na função mitocondrial, como na resposta ao estresse oxidativo e regulação da homeostase endotelial e do tônus vascular [Zhou et al., 2015]. Na HAP, esta molécula está menos expressa no VD [Vázquez-Garza et al., 2020a] e no tecido pulmonar [Zhou et al., 2015] de ratos com a doença induzida por MCT. Além disso, este efeito foi observado de forma específica em células endoteliais [Wang et al., 2020] e em PASMCs [Zurlo et al., 2018]. O tratamento com resveratrol, um polifenol com propriedades antioxidantes e cardioprotetoras, tem se mostrado promissor como agente terapêutico na HAP, inibindo de forma eficiente a muscularização dos vasos pulmonares e o remodelamento do VD. Diversos estudos sugerem que este efeito protetor está diretamente relacionado com a ativação da SIRT1 [Vázquez-Garza et al., 2020b; Yu et al., 2017; Zhou et al., 2015]. Sendo uma proteína importante no desenvolvimento e prevenção/reversão da HAP, envolvida na patofisiologia tanto dos pulmões quanto do coração, a SIRT1 foi analisada nas EVs circulantes dos animais com HAP induzida por MCT e tratados com as MSC-EVs. Corroborando os estudos citados anteriormente, a SIRT1 está menos expressa nos animais doentes, mas o tratamento impediu que houvesse essa redução e manteve os níveis desta proteína no mesmo patamar do grupo controle.

Os resultados obtidos nos experimentos I e II indicam que a função mitocondrial e a homeostase redox são partes importantes dos mecanismos que envolvem tanto o

desenvolvimento quanto a prevenção da HAP. De fato, diversos estudos da literatura já demonstraram que a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo são mecanismos patológicos presentes na HAP, e propostas terapêuticas que atuaram sobre as vias envolvidas na homeostase mitocondrial e redox foram eficazes em reverter a doença [Hogan et al., 2019; Liang et al., 2020; Liu et al., 2017; Purohit et al., 2019; Yu et al., 2017]. Sendo assim, a segunda proposta terapêutica deste estudo vai ao encontro do que já foi discutido até aqui, uma vez que a MnSOD é a principal enzima antioxidante das mitocôndrias, atuando tanto sobre a manutenção dos níveis fisiológicos de ROS, quanto na preservação da função mitocondrial [Yu and Chan, 2017]. Neste trabalho, a superexpressão desta enzima foi capaz de impedir o desenvolvimento da HAP, uma vez que a morfologia dos vasos pulmonares e do VD não foram alteradas neste grupo, preservando o fluxo pela artéria pulmonar e a função cardíaca direita. O modelo transgênico utilizado neste trabalho foi desenvolvido pelo Dr. Ruhul Abid e é exclusivo do seu grupo de pesquisa, onde foi observada redução da área infartada e melhora da função cardíaca, em um modelo animal de infarto agudo do miocárdio induzido por oclusão de um ramo da artéria coronária esquerda. Neste modelo, o aumento da expressão da MnSOD é considerado moderado, sendo em torno de 50-80% maior que os níveis normais (dados ainda não publicados).

Embora a utilização de modelos transgênicos que superexpressam a MnSOD não seja uma novidade na pesquisa experimental, poucos foram testados na HAP. Entre estes, destaca-se o estudo de Adesina e colaboradores (2015), no qual a superexpressão da MnSOD agravou o quadro patológico de camundongos com HAP induzida por hipóxia [Adesina et al., 2015]. De fato, como os próprios autores destacam no artigo, a MnSOD atua sobre a detoxificação de ânion superóxido, um radical livre altamente instável, mas, para isso, produz peróxido de hidrogênio, uma espécie reativa mais estável, porém com capacidade de oxidar biomoléculas. Apesar de não haver esta informação no artigo citado, é possível que a expressão da MnSOD neste modelo transgênico tenha sido aumentada a nível de contribuir mais para o estresse oxidativo do que o mitigar. Nesse sentido, o aumento moderado da MnSOD parece ser suficiente e ideal para manter a homeostase redox e mitocondrial e, assim, proteger contra o desenvolvimento da HAP.

Uma das vias envolvidas no efeito terapêutico da superexpressão da MnSOD sobre a HAP parece ser a do metabolismo energético mitocondrial, como observado pelo aumento da expressão da CPT1A no tecido pulmonar dos animais tratados em relação aos animais doentes não-tratados, de forma similar ao observado no experimento II. Dentro

desta gama de alterações no metabolismo energético que ocorrem na HAP, o papel da oxidação de ácidos graxos (OAG) ainda é um assunto controverso. Quando em normalidade, a OAG e o metabolismo da glicose (glicólise e oxidação da glicose - OG) são as principais fontes de ATP para as células, variando conforme o tecido. Nesse sentido, a OAG e a OG são mecanismos que se relacionam de forma inversa, ou seja, a maior ativação de uma promove inibição da outra. Esta relação é chamada de ciclo de Randle. Uma vez que a OAG utiliza 12% a mais de oxigênio para gerar a mesma quantidade de ATP, acredita-se que, em casos de baixa disponibilidade de oxigênio, como é o caso da HAP, a inibição desta via poderia favorecer a eficiência metabólica das células [Fang et al., 2012]. De fato, alguns estudos observaram que o metabolismo de lipídeos está anormal em modelos animais e em pacientes com HAP, sugerindo que a inibição desta via poderia ser benéfica contra a doença [Shi and Su, 2020]. No estudo de Niu e colaboradores (2022), o tratamento de PSMCs com um composto natural derivado da cumarina impediu a hiper proliferação destas células através da sua ação sobre o metabolismo de lipídeos, diminuindo os níveis de proteínas relacionadas à OAG nas células, como a CPT1A [Niu et al., 2022]. Como mencionado no início deste parágrafo, este assunto é controverso, pois, apesar da desregulação do metabolismo lipídico ser um fator importante na HAP, estudos sugerem que justamente a inibição da OAG favorece o acúmulo intracelular de lipídeos que causam lipotoxicidade [Li et al., 2019]. No estudo de Brittain e colaboradores (2016), o aumento dos níveis de ácidos graxos livres na circulação e no tecido cardíaco direito de humanos com HAP foi associado com a insuficiência do VD e piora no prognóstico da doença [Brittain et al., 2016]. Dessa forma, a maior atividade da CPT1A, enzima que atua no transporte de ácidos graxos do citosol para a matriz mitocondrial, está relacionada com a diminuição dos níveis de lipídeos intracelulares [Li et al., 2019]. De fato, no estudo de Legchenko e colaboradores (2018), o tratamento com o fármaco pioglitazone impediu o aumento da lipotoxicidade e distúrbios na função mitocondrial de cardiomiócitos no VD, prevenindo a insuficiência cardíaca direita e revertendo a HAP induzida por hipóxia + SU5416. Estes efeitos foram relacionados ao aumento da OAG nos animais tratados [Legchenko et al., 2018]. Sendo assim, no presente trabalho, ambos os tratamentos relatados nos experimentos II e III parecem modular o metabolismo lipídico através do aumento da OAG, regulando, conseqüentemente, o metabolismo mitocondrial. É importante salientar que a proposta terapêutica neste trabalho é de prevenção da HAP através do tratamento concomitante às injeções de MCT, e os resultados morfológicos e funcionais demonstraram que, de fato,

não houve desenvolvimento da doença nos animais tratados. Em vista disto, se não há desenvolvimento da HAP nestes animais, também não há diminuição da oferta de oxigênio para os órgãos, então o aumento dos níveis de CPT1A, e, assim, da OAG, é importante para a manutenção da respiração mitocondrial como fonte de ATP, utilizando principalmente ácidos graxos como “combustível”. Pode-se concluir, então, que o aumento da OAG induzida pelos tratamentos esteja relacionado à adaptação metabólica contra o desenvolvimento da doença.

Por fim, é possível que a resposta benéfica mediada pelo aumento da MnSOD nas células endoteliais estenda-se a outras células vulneráveis à ação da doença, como as células musculares lisas dos vasos pulmonares e os cardiomiócitos do VD. Embora não avaliado neste trabalho, pode-se presumir que há uma comunicação parácrina mediada por EVs entre estas células, promovendo, então, a sinalização adaptativa redox e mitocondrial contra o desenvolvimento da HAP.

6. Considerações finais

Os resultados apresentados ao longo deste trabalho permitem concluir que o desequilíbrio da homeostase redox e mitocondrial é um processo importante na patogênese da HAP. As duas propostas terapêuticas, MSC-EVs e superexpressão da MnSOD, foram eficazes em prevenir o desenvolvimento da doença provavelmente por regular vias envolvidas no metabolismo mitocondrial, impedindo uma disfunção mitocondrial que poderia levar a distúrbios no metabolismo energético celular e aumento do estresse oxidativo, sinais característicos da HAP. Neste sentido, há um papel relevante das EVs na comunicação intercelular, tanto durante a progressão da doença, mediando respostas adaptativas redox e mitocondriais em outros órgãos, como observado no cérebro, quanto na resposta terapêutica promovida pelos tratamentos.

7. Perspectivas

Uma análise mais aprofundada em relação aos mecanismos relacionados aos efeitos terapêuticos do tratamento com as MSC-EVs e do modelo de superexpressão da MnSOD é necessária. Sendo assim, alguns experimentos previstos são:

Experimento II:

- Análise proteômica das EVs derivadas do sangue dos animais, em diferentes tempos de desenvolvimento da HAP;
- Análise da expressão proteica de outras proteínas relacionadas ao metabolismo redox e mitocondrial no tecido pulmonar e no VD;
- Imunofluorescência do tecido pulmonar e do VD para determinar se a expressão das proteínas envolvidas no metabolismo redox e mitocondrial se difere em relação ao tipo de célula, comparando, principalmente, células endoteliais e células do músculo liso.

Experimento III:

- Análise da expressão proteica de proteínas relacionadas ao metabolismo redox e mitocondrial no tecido pulmonar, no VD e nas EVs circulantes;
- Imunofluorescência do tecido pulmonar e do VD para determinar se a expressão das proteínas envolvidas no metabolismo redox e mitocondrial se difere em relação ao tipo de célula, comparando, principalmente, células endoteliais e células do músculo liso.

8. Referências

Abrams D, Brodie D, Rosenzweig E, KM B, Agerstrand C, Bacchetta M. 2013. Upper-body extracorporeal membrane oxygenation as a strategy in decompensated pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ* 3(2):432–435.

Adesina SE, Kang BY, Bijli KM, Ma J, Cheng J, Murphy TC, Michael Hart C, Sutliff RL. 2015. Targeting mitochondrial reactive oxygen species to modulate hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Free Radic Biol Med* 87:36.

Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–6.

Aggarwal S, Gross CM, Sharma S, Fineman JR, Black SM. 2013. Reactive oxygen species in pulmonary vascular remodeling. *Compr Physiol* 3(3):1011.

Akerboom TP, Sies H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and

glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 77:373–82.

Aliotta JM, Pereira M, Amaral A, Sorokina A, Igbinoba Z, Hasslinger A, El-Bizri R, Rounds SI, Quesenberry PJ, Klinger JR. 2013. Editor's choice: Induction of pulmonary hypertensive changes by extracellular vesicles from monocrotaline-treated mice. *Cardiovasc Res* 100(3):354.

Aliotta JM, Pereira M, Wen S, Dooner MS, Tatto M Del, Papa E, Cheng Y, Goldberg L, Ventetuolo CE, Liang O, Klinger JR, Quesenberry PJ. 2017. Bone Marrow Endothelial Progenitor Cells Are the Cellular Mediators of Pulmonary Hypertension in the Murine Monocrotaline Injury Model. *Stem Cells Transl Med* 6(7):1595.

Aliotta JM, Pereira M, Wen S, Dooner MS, Tatto M Del, Papa E, Goldberg LR, Baird GL, Ventetuolo CE, Quesenberry PJ, Klinger JR. 2016. Exosomes induce and reverse monocrotaline-induced pulmonary hypertension in mice. *Cardiovasc Res* 110(3):319–330.

Alruwaili N, Kandhi S, Sun D, Wolin MS. 2019. Metabolism and Redox in Pulmonary Vascular Physiology and Pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 31(10):752.

Amsar RM, Wijaya CH, Ana ID, Hidajah AC, Notobroto HB, Wungu TDK, Barlian A. 2022. Extracellular vesicles: a promising cell-free therapy for cartilage repair. *Futur Sci OA* 8(2).

Araujo-Abad S, Saceda M, Juan Romero C de. 2022. Biomedical application of small extracellular vesicles in cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev* 182:114117.

Archer SL, Michelakis ED. 2009. clinical therapeutics Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors for Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 361:1864–71.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. 2014. Oxidative Medicine and Cellular Longevity.

Barst R, Rubin L, Long W, McGoon M, Rich S, Badesch D, Groves B, Tapson V, Bourge R, Brundage B, Koerner S, Langleben D, Keller C, Murali S, Uretsky B, Clayton L, Jöbsis M, Blackburn S, Shortino D, Crow J. 1996. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 334(5):993.

Bello-Klein A, Mancardi D, Araujo AS, Schenkel PC, Turck P, Lima Seolin BG de. 2018. Role of Redox Homeostasis and Inflammation in the Pathogenesis of Pulmonary

- Arterial Hypertension. *Curr Med Chem* 25(11):1340–1351.
- Boehme J, Sun X, Tormos K V., Gong W, Kellner M, Datar SA, Kameny RJ, Yuan JXJ, Raff GW, Fineman JR, Black SM, Maltepe E. 2016. Cardiovascular Mitochondria and Redox Control in Health and Disease: Pulmonary artery smooth muscle cell hyperproliferation and metabolic shift triggered by pulmonary overcirculation. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 311(4):H944.
- Bonnefont-Rousselot D. 2016. Resveratrol and Cardiovascular Diseases. *Nutrients* 8(5).
- Bost F, Kaminski L. 2019. The metabolic modulator PGC-1 α in cancer. *Am J Cancer Res* 9(2):198–211.
- Bresciani G, M[^] Anica Da Cruz IB, González-Gallego J. 2015. Manganese Superoxide Dismutase and Oxidative Stress Modulation. *Adv Clin Chem* 83–126.
- Brittain E, Penner NL, West J, Hemnes A. 2013. Echocardiographic assessment of the right heart in mice. *J Vis Exp* (81). <https://doi.org/10.3791/50912>.
- Brittain EL, Talati M, Fessel JP, Zhu H, Penner N, Calcutt MW, West JD, Funke M, Lewis GD, Gerszten RE, Hamid R, Pugh ME, Austin ED, Newman JH, Hemnes AR. 2016. Fatty Acid Metabolic Defects and Right Ventricular Lipotoxicity in Human Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 133(20):1936.
- Bueno-Beti C, Hadri L, Hajjar RJ, Sassi Y. The Sugen 5416/Hypoxia Mouse Model of Pulmonary Arterial Hypertension. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8597-5_19.
- Candas D, Li JJ. 2014. MnSOD in Oxidative Stress Response-Potential Regulation via Mitochondrial Protein Influx. *Antioxid Redox Signal* 20(10):1599.
- Carman BL, Predescu DN, Machado R, Predescu SA. 2019. Plexiform Arteriopathy in Rodent Models of Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Pathol* 189(6):1133.
- Cassady S, Ramani G V. 2020. *Cardiology Clinics*.
- Chen H, Wang L, Zeng X, Schwarz H, Nanda HS, Peng X, Zhou Y. 2021. Exosomes, a New Star for Targeted Delivery. *Front Cell Dev Biol* 9.
- Chen JM, Zhang QS, Li XY, Gong X, Ruan YJ, Zeng SJ, Lu LL, Qi XX, Wang Y, Hu M, Zhu LJ, Liu ZQ. 2018. Tissue Distribution and Gender-Specific Protein Expression of Cytochrome P450 in five Mouse Genotypes with a Background of FVB. *Pharm Res*

35(6).

Chen JY, An R, Liu ZJ, Wang JJ, Chen SZ, Hong MM, Liu JH, Xiao MY, Chen YF. 2014. Therapeutic effects of mesenchymal stem cell-derived microvesicles on pulmonary arterial hypertension in rats. *Acta Pharmacol Sin* 35(9):1121.

Chen Z, Siu B, Ho YS, Vincent R, Chua CC, Hamdy RC, Chua BHL. 1998. Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 30(11):2281–2289.

Cho ES, Cha YH, Kim HS, Kim NH, Yook JI. 2018. The Pentose Phosphate Pathway as a Potential Target for Cancer Therapy. *Biomol Ther (Seoul)* 26(1):29.

Choudhury FK. 2021. Mitochondrial Redox Metabolism: The Epicenter of Metabolism during Cancer Progression. *Antioxidants* 10(11):1838.

Colombo M, Raposo G, Théry C. 2014. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30:255–289.

Colombo R, Siqueira R, Becker CU, Fernandes TG, Pires KM, Valença SS, Souza-Rabbo MP, Araujo AS, Belló-Klein A. 2013. Effects of exercise on monocrotaline-induced changes in right heart function and pulmonary artery remodeling in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 91(1):38–44.

Corcoran SE, O'Neill LAJ. 2016. HIF1 α and metabolic reprogramming in inflammation. *J Clin Invest* 126(10):3699.

Corrado C, Fontana S. 2020. Hypoxia and HIF Signaling: One Axis with Divergent Effects. *Int J Mol Sci* 21(16):1–17.

Cottrill KA, Chan SY. 2013. Metabolic Dysfunction in Pulmonary Hypertension: The Expanding Relevance of the Warburg Effect. *Eur J Clin Invest* 43(8):855–865.

Dignam JP, Scott TE, Kemp-Harper BK, Hobbs AJ. 2021. Animal models of pulmonary hypertension: Getting to the heart of the problem. *Br J Pharmacol*.
<https://doi.org/10.1111/BPH.15444>.

Dore MP, Parodi G, Portoghese M, Pes GM. 2021. The Controversial Role of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency on Cardiovascular Disease: A Narrative

Review. *Oxid Med Cell Longev* 2021.

Fang YH, Piao L, Hong Z, Toth PT, Marsboom G, Bache-Wiig P, Rehman J, Archer SL. 2012. Therapeutic inhibition of fatty acid oxidation in right ventricular hypertrophy: exploiting Randle's cycle. *J Mol Med (Berl)* 90(1):31–43.

Farahmand F, Hill MF, Singal PK. 2004. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. *Mol Cell Biochem* 260(1):21–29.

Fazal S, Bissierier M, Hadri L. 2021. *Cells*.

Ferguson GD, Bridge WJ. 2019. *Redox Biology*.

Finck BN, Kelly DP. 2007. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Coactivator-1 (PGC-1) Regulatory Cascade in Cardiac Physiology and Disease. *Circulation* 115(19):2540–2548.

Flohé L, Günzler WA. 1984. [12] Assays of Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymol* 105(C):114–120.

Forman HJ. 2016. *Free Radical Biology and Medicine*.

Fulton RM, Hutchinson EC, Jones AM. 1952. Ventricular weight in cardiac hypertrophy. *Br Heart J* 14(3):413–420.

Galiè N, Olschewski H, Oudiz R, Torres F, Frost A, Ghofrani H, Badesch D, McGoon M, McLaughlin V, Roecker E, Gerber M, Dufton C, Wiens B, Rubin L. 2008.

Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. *Circulation* 117(23):265–280.

García-Niño WR, Zazueta C, Buelna-Chontal M, Silva-Palacios A. 2021. Mitochondrial Quality Control in Cardiac-Conditioning Strategies against Ischemia-Reperfusion Injury. *Life* 11(11):1123.

Gaschler MM, Stockwell BR. 2017. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.

Gassart A De, Géminard C, Février B, Raposo G, Vidal M. 2003. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* 102(13):4336–4344.

Ghofrani H, Galiè N, Grimminger F, Grünig E, Humbert M, Jing Z, Keogh A,

- Langleben D, Kilama M, Fritsch A, Neuser D, Rubin L. 2013. Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 369(4):330–340.
- Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, Farkas D, Kraskauskas D, Voelkel NF, Bogaard HJ. 2012. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 302(4):363–369.
- Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A. 1991. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med* 10(2):93–100.
- Griendling KK, Touyz RM, Zweier JL, Dikalov S, Chilian W, Chen YR, Harrison DG, Bhatnagar A. 2016. *Circulation Research*.
- Grobs Y, Awada C, Lemay SE, Romanet C, Bourgeois A, Toro V, Nadeau V, Shimauchi K, Orcholski M, Breuils-Bonnet S, Tremblay E, Provencher S, Paulin R, Boucherat O, Bonnet S. 2021. Preclinical investigation of trifluoperazine as a novel therapeutic agent for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Int J Mol Sci* 22(6):1–15.
- Gudenschwager C, Chavez I, Cardenas C, Gonzalez-Billault C. 2021. Directly Reprogrammed Human Neurons to Understand Age-Related Energy Metabolism Impairment and Mitochondrial Dysfunction in Healthy Aging and Neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev* 2021.
- Gunton JE. 2020. Hypoxia-inducible factors and diabetes. *J Clin Invest* 130(10):5063.
- Hajj MC El, Viray MC, Tedford RJ. 2020. *Cardiology Clinics*.
- He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. 2017. *Cellular Physiology and Biochemistry*.
- He Y, Lian W, Ding L, Fan X, Ma J, Zhang QY, Ding X, Lin G. 2021. Lung injury induced by pyrrolizidine alkaloids depends on metabolism by hepatic cytochrome P450s and blood transport of reactive metabolites. *Arch Toxicol* 95(1):103.
- Hidalgo DC, Elajaili H, Suliman H, George MP, Delaney C, Nozik E. 2022. Metabolism, Mitochondrial Dysfunction, and Redox Homeostasis in Pulmonary Hypertension. *Antioxidants* 11(2):428.
- Hoeper MM, Humbert M, Souza R, Idrees M, Kawut SM, Sliwa-Hahnle K, Jing ZC,

- Gibbs JSR. 2016. *The Lancet Respiratory Medicine*.
- Hogan SE, Rodriguez Salazar MP, Cheadle J, Glenn R, Medrano C, Petersen TH, Ilagan RM. 2019. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes improve mitochondrial health in pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* 316(5):L723–L737.
- Holley AK, Dhar SK, Xu Y, Clair DKS. 2012. Manganese superoxide dismutase: beyond life and death. *Amino Acids* 42(1):139.
- Jasińska-Stroschein M. 2021. A review of rodent models for metabolic syndromes and pulmonary hypertension. *Toxicol Appl Pharmacol* 425:115599.
- Ježek P, Holendová B, Plecítá-hlavatá L. 2020. Redox Signaling from Mitochondria: Signal Propagation and Its Targets. *Biomolecules* 10(1).
- Jones DP. 2006. Redefining Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal* 8(9–10):1865–1879.
- Keen J, Prisco SZ, Prins KW. 2021. *Frontiers in Physiology*.
- Kitagawa A, Jacob C, Jordan A, Waddell I, McMurtry IF, Gupte SA. 2021. Inhibition of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Activity Attenuates Right Ventricle Pressure and Hypertrophy Elicited by VEGFR Inhibitor + Hypoxia. *J Pharmacol Exp Ther* 377(2):284–292.
- Klinger JR, Pereira M, Tatto M Del, Brodsky AS, Wu KQ, Dooner MS, Borgovan T, Wen S, Goldberg LR, Aliotta JM, Ventetuolo CE, Quesenberry PJ, Liang OD. 2020a. Mesenchymal Stem Cell Extracellular Vesicles Reverse Sugen/Hypoxia Pulmonary Hypertension in Rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 62(5):577.
- Klinger JR, Pereira M, Tatto M Del, Brodsky AS, Wu KQ, Dooner MS, Borgovan T, Wen S, Goldberg LR, Aliotta JM, Ventetuolo CE, Quesenberry PJ, Liang OD. 2020b. Mesenchymal stem cell extracellular vesicles reverse sugen/hypoxia pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 62(5):577–587.
- Klinger JR, Pereira M, Tatto M Del, Dooner MS, Wen S, Quesenberry PJ, Liang OD. 2021. Effect of dose, dosing intervals, and hypoxic stress on the reversal of pulmonary hypertension by mesenchymal stem cell extracellular vesicles. *Pulm Circ* 11(4):1–11.
- Koskenvuo JW, Mirsky R, Zhang Y, Angeli FS, Jahn S, Alastalo T-P, Schiller NB,

- Boyle AJ, Chatterjee K, Marco T De, Yeghiazarians Y. 2010. A comparison of echocardiography to invasive measurement in the evaluation of pulmonary arterial hypertension in a rat model. *Int J Cardiovasc Imaging* 26(5):509–18.
- Kovacs G, Dumitrescu D, Barner A, Greiner S, Grünig E, Hager A, Köhler T, Kozlik-Feldmann R, Kruck I, Lammers AE, Mereles D, Meyer A, Meyer J, Pabst S, Seyfarth HJ, Sinning C, Sorichter S, Stähler G, Wilkens H, Held M. 2018. Definition, clinical classification and initial diagnosis of pulmonary hypertension: Updated recommendations from the Cologne Consensus Conference 2018.
- Kraus D, Reckenbeil J, Wenghoefer M, Stark H, Frentzen M, Allam JP, Novak N, Frede S, Götz W, Probstmeier R, Meyer R, Winter J. 2016. Ghrelin promotes oral tumor cell proliferation by modifying GLUT1 expression. *Cell Mol Life Sci* 73(6):1287–1299.
- Kwak HB, Lee Y, Kim JH, Remmen H Van, Richardson AG, Lawler JM. 2015. MnSOD overexpression reduces fibrosis and pro-apoptotic signaling in the aging mouse heart. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 70(5):533–544.
- Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. 1992. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chem Res Toxicol* 5(2):227–231.
- Lee C, Mitsialis SA, Aslam M, Vitali SH, Vergadi E, Konstantinou G, Sdrimas K, Fernandez-Gonzalez A, Kourembanas S. 2012a. Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 126(22):2601–11.
- Lee J, Giordano S, Zhang J. 2012b. *Biochemical Journal*.
- Lee KH, Cha M, Lee BH. 2021. Crosstalk between Neuron and Glial Cells in Oxidative Injury and Neuroprotection. *Int J Mol Sci* 22(24).
- Legchenko E, Chouvarine P, Borchert P, Fernandez-Gonzalez A, Snay E, Meier M, Maegel L, Mitsialis SA, Rog-Zielinska EA, Kourembanas S, Jonigk D, Hansmann G. 2018. PPAR γ agonist pioglitazone reverses pulmonary hypertension and prevents right heart failure via fatty acid oxidation. *Sci Transl Med* 10(438).
- Leong SF, Clark JB. 1984. Regional Development of Glutamate Dehydrogenase in the at Brain. *J Neurochem* 43(1):106–111.

- Leopold JA, Maron BA. 2016. Molecular Mechanisms of Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Int J Mol Sci* 17(5).
- Levine DJ. 2021. Pulmonary arterial hypertension: updates in epidemiology and evaluation of patients. *Am J Manag Care* 27(3):S35–S41.
- Li S, Zhai C, Shi W, Feng W, Xie X, Pan Y, Wang J, Yan X, Chai L, Wang Q, Zhang Q, Liu P, Li M. 2020. Leukotriene B₄ induces proliferation of rat pulmonary arterial smooth muscle cells via modulating GSK-3 β / β -catenin pathway. *Eur J Pharmacol* 867.
- Li X, Kumar A, Carmeliet P. 2019. Metabolic Pathways Fueling the Endothelial Cell Drive. *Annu Rev Physiol* 81:483–503.
- Liang B, Zhu Y-C, Lu J, Gu N. 2021. Effects of Traditional Chinese Medication-Based Bioactive Compounds on Cellular and Molecular Mechanisms of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* 2021:1–9.
- Liang D, Zhuo Y, Guo Z, He L, Wang X, He Y, Li L, Dai H. 2020. SIRT1/PGC-1 pathway activation triggers autophagy/mitophagy and attenuates oxidative damage in intestinal epithelial cells. *Biochimie* 170:10–20.
- Liang H, Ward WF. 2006. PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ* 30(4):145–151.
- Liu A, Philip J, Vinnakota KC, Bergh F Van den, Tabima DM, Hacker T, Beard DA, Chesler NC. 2017. Estrogen maintains mitochondrial content and function in the right ventricle of rats with pulmonary hypertension. *Physiol Rep* 5(6).
- Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. 1985. Comparison of Lipid Peroxidation and Myocardial Damage Induced by Adriamycin and 4'-epiadriamycin in Mice - PubMed. *Tumori* 71:523–530.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265–75.
- Łuczaj W, Gęgotek A, Skrzydlewska E. 2017. Free Radical Biology and Medicine.
- Ludke ARL, Mosele F, Caron-Lienert R, Ribeiro MF, Partata W, Llesuy S, Araujo AS, Singal P, Belló-Klein A. 2010. Modulation of Monocrotaline-Induced Cor Pulmonale by Grape Juice. *J Cardiovasc Pharmacol* 55(1):89–95.

Lv J, Bhatia M, Wang X, Lv J, Bhatia M, Wang X. Roles of Mitochondrial DNA in Energy Metabolism Abbreviations ETC Electron transport chain HSP1 Heavy-strand promoter 1 LSP Light-strand promoter mtDNA Mitochondrial DNA OXPHOS Oxidative phosphorylation POLRMT Single-subunit RNA polymerase ROS Reactive oxygen species TFAM Mitochondrial transcription factor A TFB2M Mitochondrial transcription factor B2 1 Introduction. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6674-0_6.

Malenfant S, Brassard P, Paquette M, Blanc O Le, Chouinard A, Nadeau V, Allan PD, Tzeng YC, Simard S, Bonnet S, Provencher S. 2017. Compromised Cerebrovascular Regulation and Cerebral Oxygenation in Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Hear Assoc Cardiovasc Cerebrovasc Dis* 6(10).

Marklund SL. 1985. Product of extracellular-superoxide dismutase catalysis. *FEBS Lett* 184(2):237–9.

Martínez-Reyes I, Chandel NS. 2020. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun* 11(1).

McLaughlin V, Benza R, Rubin L, Channick R, Voswinckel R, Tapson V, Robbins I, Olschewski H, Rubenfire M, Seeger W. 2010. Addition of inhaled treprostinil to oral therapy for pulmonary arterial hypertension: a randomized controlled clinical trial. *J Am Coll Cardiol* 55(18):1915–1922.

Meldolesi J. 2021. Extracellular vesicles (exosomes and ectosomes) play key roles in the pathology of brain diseases. *Mol Biomed* 2(1).

Mikhael M, Makar C, Wissa A, Le T, Eghbali M, Umar S. 2019. Oxidative Stress and Its Implications in the Right Ventricular Remodeling Secondary to Pulmonary Hypertension. *Front Physiol* 10(SEP):1233.

Miriyala S, Spasojevic I, Tovmasyan A, Salvemini D, Vujaskovic Z, Clair D St., Batinic-Haberle I. 2012. Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1822(5):794–814.

Morris H, Denver N, Gaw R, Labazi H, Mair K, MacLean MR. 2021. *Clinics in Chest Medicine*.

Naeije R, Vanderpool R, Peacock A, Badagliacca R. 2018. *Heart Failure Clinics*.

Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. 2019. Role of Catalase in Oxidative Stress- And

- Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2019.
- Nickel NP, O’Leary JM, Brittain EL, Fessel JP, Zamanian RT, West JD, Austin ED. 2017. Kidney dysfunction in patients with pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ* 7(1):38.
- Nickel NP, Yuan K, Dorfmuller P, Provencher S, Lai YC, Bonnet S, Austin ED, Koch CD, Morris A, Perros F, Montani D, Zamanian RT, Jesus Perez VA De. 2020. Beyond the lungs: Systemic manifestations of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 201(2):148–157.
- Niu Z, Fu M, Li Y, Ren H, Zhang X, Yao L. 2022. Osthole alleviates pulmonary vascular remodeling by modulating microRNA-22–3p mediated lipid metabolic reprogramming. *Phytomedicine* 96:153840.
- Nogueira-Ferreira R, Vitorino R, Ferreira R, Henriques-Coelho T. 2015. Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. *Pulm Pharmacol Ther* 35:8–16.
- Palma FR, He C, Danes JM, Paviani V, Coelho DR, Gantner BN, Bonini MG. 2020. Mitochondrial Superoxide Dismutase: What the Established, the Intriguing, and the Novel Reveal About a Key Cellular Redox Switch. *Antioxid Redox Signal* 32(10):701.
- Parikh V, Bhardwaj A, Nair A. 2019. Pharmacotherapy for pulmonary arterial hypertension. *J Thorac Dis* 11(Suppl 14):S1767.
- Park KH, Park WJ. 2015. *Journal of Korean Medical Science*.
- Peoples JN, Saraf A, Ghazal N, Pham TT, Kwong JQ. 2019. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. *Exp Mol Med* 51(12).
- Pfaff AR, Beltz J, King E, Ercal N. 2019. Medicinal Thiols: Current Status and New Perspectives. *Mini-Reviews Med Chem* 20(6):513–529.
- Piao L, Sidhu VK, Fang YH, Ryan JJ, Parikh KS, Hong Z, Toth PT, Morrow E, Kutty S, Lopaschuk GD, Archer SL. 2013. FOXO1-mediated Upregulation of Pyruvate Dehydrogenase Kinase-4 (PDK4) Decreases Glucose Oxidation and Impairs Right Ventricular Function in Pulmonary Hypertension: Therapeutic Benefits of Dichloroacetate. *J Mol Med (Berl)* 91(3):333.

Piscoya Roncal CG, Mendes AA, Muniz MTC, Oliveira SA de, Valle Neto LM do, Vasconcellos Piscoya NA de, Góes GHB, Sobral Filho DC, Gomberg-Maitland M. 2019. Schistosomiasis-associated pulmonary arterial hypertension: survival in endemic area in Brazil. *IJC Hear Vasc* 25.

Pol E Van Der, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, Leeuwen TG Van, Nieuwland R. 2010. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*.

Popov LD. 2020. Mitochondrial biogenesis: An update. *J Cell Mol Med* 24(9):4892.

Prins KW, Thenappan T. 2016. *Cardiology Clinics*.

Pulido T, Adzerikho I, Channick R, Delcroix M, Galiè N, Ghofrani H, Jansa P, Jing Z, Brun F Le, Mehta S, Mittelholzer C, Perchenet L, Sastry B, Sitbon O, Souza R, Torbicki A, Zeng X, Rubin L, Simonneau G. 2013. Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 369(9):809–818.

Punnoose L, Burkhoff D, Rich S, Horn E. 2012. Right ventricular assist device in end-stage pulmonary arterial hypertension: insights from a computational model of the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* 55(2):234–243.e2.

Purohit PK, Edwards R, Tokatlidis K, Saini N. 2019. MiR-195 regulates mitochondrial function by targeting mitofusin-2 in breast cancer cells. *RNA Biol* 16(7):918–929.

Quesenberry PJ, Goldberg LR, Aliotta JM, Dooner MS, Pereira MG, Wen S, Camussi G. 2014. Cellular phenotype and extracellular vesicles: basic and clinical considerations. *Stem Cells Dev* 23(13):1429–1436.

Rafikova O, Ghoulé I Al, Rafikov R. 2019. Focus on Early Events: Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension Development. *Antioxid Redox Signal* 31(13):933.

Raposo G, Stoorvogel W. 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200(4):373.

Rich PR, Maréchal A. 2010. The mitochondrial respiratory chain. *Essays Biochem* 47:1–23.

Rosenthal RE, Hamud F, Fiskum G, Varghese PJ, Sharpe S. 1987. Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. *J Cereb Blood Flow Metab* 7(6):752–758.

- Rubin L, Badesch D, Barst R, Galie N, Black C, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G. 2002. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 346(12):896–903.
- Ryan JJ, Huston J, Kutty S, Hatton ND, Bowman L, Tian L, Herr JE, Johri AM, Archer SL. 2015. Right Ventricular Adaptation and Failure in Pulmonary Arterial Hypertension. *Can J Cardiol* 31(4):391.
- Sajnani K, Islam F, Anthony Smith R, Gopalan V, King-Yin Lam A. 2017. Genetic alterations in Krebs cycle and its impact on cancer pathogenesis *Biochimie*.
- Salim S. 2017. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther* 360(1):201.
- Sanz J, Sánchez-Quintana D, Bossone E, Bogaard HJ, Naeije R. 2019. *Journal of the American College of Cardiology*.
- Schieber M, Chandel NS. 2014. *Current Biology*.
- Scrimgeour LA, Potz BA, Aboul Gheit A, Shi G, Stanley M, Zhang Z, Sodha NR, Ahsan N, Abid MR, Sellke FW. 2019. Extracellular Vesicles Promote Arteriogenesis in Chronically Ischemic Myocardium in the Setting of Metabolic Syndrome. *J Am Heart Assoc* 8(15).
- Sedlak J, Lindsay RH. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25(1):192–205.
- Senoner T, Dichtl W. 2019. *Nutrients*.
- Sepasi Tehrani H, Moosavi-Movahedi AA. 2018. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*.
- Shadel GS, Horvath TL. 2015. Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis. *Cell* 163(3):560.
- Shepherd D, Garland PB. 1969. [2] Citrate synthase from rat liver: [EC 4.1.3.7 Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. *Methods Enzymol* 13:11–16.
- Shi X fan, Su Y chao. 2020. Vascular Metabolic Mechanisms of Pulmonary Hypertension. *Curr Med Sci* 40(3):444–454.
- Shimoda LA, Laurie SS. 2013. *Journal of Molecular Medicine*.

- Shults N V., Melnyk O, Suzuki DI, Suzuki YJ. 2018. Redox Biology of Right-Sided Heart Failure. *Antioxidants* 7(8).
- Sies H. 1997. *Experimental Physiology*.
- Sies H. 2015. *Redox Biology*.
- Sies H, Berndt C, Jones DP. 2017. Oxidative Stress. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem>.
- Sies H, Jones DP. 2020. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, Williams PG, Souza R. 2019. *The European respiratory journal*.
- Sitbon O, Channick R, Chin K, Frey A, Gaine S, Galiè N, Ghofrani H, Hoeper M, Lang I, Preiss R, Rubin L, Scala L Di, Tapson V, Adzerikho I, Liu J, Moiseeva O, Zeng X, Simonneau G, McLaughlin V. 2015. Selexipag for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 373(26):2522–2533.
- Sklepkiwicz P, Schermuly RT, Tian X, Ghofrani HA, Weissmann N, Sedding D, Kashour T, Seeger W, Grimminger F, Pullamsetti SS. 2011. Glycogen synthase kinase 3beta contributes to proliferation of arterial smooth muscle cells in pulmonary hypertension. *PLoS One* 6(4).
- Smolders VFED, Rodríguez C, Blanco I, Szulcek R, Timens W, Piccari L, Roger Y, Hu X, Morén C, Bonjoch C, Sebastián L, Castellà M, Osorio J, Peinado VI, Bogaard HJ, Quax PHA, Cascante M, Barberà JA, Tura-Ceide O. 2022. Metabolic profile in endothelial cells of chronic thromboembolic pulmonary hypertension and pulmonary arterial hypertension. *Sci Rep* 12(1):2283.
- Song Y, Xu Y, Liu Y, Gao J, Feng L, Zhang Y, Shi L, Zhang M, Guo D, Qi B, Zhang M. 2021. Mitochondrial Quality Control in the Maintenance of Cardiovascular Homeostasis: The Roles and Interregulation of UPS, Mitochondrial Dynamics and Mitophagy. *Oxid Med Cell Longev* 2021(14):1–12.
- Stącel T, Latos M, Urlik M, Nęcki M, Antończyk R, Hrapkiewicz T, Kurzyna M, Ochman M. 2021. Interventional and Surgical Treatments for Pulmonary Arterial Hypertension. *J Clin Med* 10(15):3326.

Stincone A, Prigione A, Cramer T, Wamelink MMC, Campbell K, Cheung E, Olin-Sandoval V, Grüning NM, Krüger A, Tauqueer Alam M, Keller MA, Breitenbach M, Brindle KM, Rabinowitz JD, Ralser M. 2015. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol Rev Camb Philos Soc* 90(3):927.

Stone WL, Basit H, Mohiuddin SS. 2019. *Biochemistry, Antioxidants*. StatPearls Publishing.

Suliman HB, Nozik-Grayck E. 2019. Mitochondrial Dysfunction: Metabolic Drivers of Pulmonary Hypertension. *Antioxid Redox Signal* 31(12):843.

Suntar I, Sureda A, Belwal T, Sanches Silva A, Vacca RA, Tewari D, Sobarzo-Sánchez E, Nabavi SF, Shirooie S, Dehpour AR, Xu S, Yousefi B, Majidinia M, Daglia M, D'Antona G, Nabavi SM. 2020. Natural products, PGC-1 α , and Duchenne muscular dystrophy. *Acta Pharm Sin B* 10(5):734.

Sztuka K, Jasińska-Jasińska-Stroschein M, Jasińska-Stroschein M. 2017. Title: Animal models of pulmonary arterial hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis of data from 6,126 animals Animal models of pulmonary arterial hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis of data from 6,126 animals. *Pharmacol Res*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.08.003>.

Tang BL. 2016. Sirt1 and the Mitochondria. *Mol Cells* 39(2):87.

Tang BL. 2019. Neuroprotection by glucose-6-phosphate dehydrogenase and the pentose phosphate pathway. *J Cell Biochem* 120(9):14285–14295.

Ten VS, Ratner V. 2020. Mitochondrial bioenergetics and pulmonary dysfunction: current progress and future directions. *Paediatr Respir Rev* 34:37–45.

Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. 2006. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 30(1):3.22.1-3.22.29.

Vázquez-Garza E, Bernal-Ramírez J, Jerjes-Sánchez C, Lozano O, Acuña-Morín E, Vanoye-Tamez M, Ramos-González MR, Chapoy-Villanueva H, Pérez-Plata L, Sánchez-Trujillo L, Torre-Amione G, Ramírez-Rivera A, García-Rivas G. 2020a. Resveratrol Prevents Right Ventricle Remodeling and Dysfunction in Monocrotaline-

Induced Pulmonary Arterial Hypertension with a Limited Improvement in the Lung Vasculature. *Oxid Med Cell Longev* 2020:13.

Vázquez-Garza E, Bernal-Ramírez J, Jerjes-Sánchez C, Lozano O, Acuña-Morín E, Vanoye-Tamez M, Ramos-González MR, Chapoy-Villanueva H, Pérez-Plata L, Sánchez-Trujillo L, Torre-Amione G, Ramírez-Rivera A, García-Rivas G. 2020b. Resveratrol Prevents Right Ventricle Remodeling and Dysfunction in Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension with a Limited Improvement in the Lung Vasculature. *Oxid Med Cell Longev* 2020:13.

Vitali SH, Mitsialis AS, Liang OD, Liu X, Fernandez-Gonzalez A, Christou H, Wu X, McGowan FX, Kourembanas S. 2009. Divergent cardiopulmonary actions of heme oxygenase enzymatic products in chronic hypoxia. *PLoS One* 4(6).

Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. 2018. *Journal of Cell Biology*.

Wang Y, Zhong B, Wu Q, Tong J, Zhu T, Zhang M. 2020. Effect of Aldosterone on Senescence and Proliferation Inhibition of Endothelial Progenitor Cells Induced by Sirtuin 1 (SIRT1) in Pulmonary Arterial Hypertension. *Med Sci Monit* 26:e920678-1.

Wei Y, Sowers JR, Nistala R, Gong H, Uptergrove GM-E, Clark SE, Morris EM, Szary N, Manrique C, Stump CS. 2006. Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 281(46):35137–46.

Wen S, Dooner M, Cheng Y, Papa E, Tatto M Del, Pereira M, Deng Y, Goldberg L, Aliotta J, Chatterjee D, Stewart C, Carpanetto A, Collino F, Bruno S, Camussi G, Quesenberry P. 2016. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles rescue radiation damage to murine marrow hematopoietic cells. *Leukemia* 30(11):2221–2231.

Wen S, Dooner M, Papa E, Tatto M Del, Pereira M, Borgovan T, Cheng Y, Goldberg L, Liang O, Camussi G, Quesenberry P. 2019. Biodistribution of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a radiation injury bone marrow murine model. *Int J Mol Sci* 20(21).

Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, Silva AC, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NHH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Krämer-Albers E-M, Laitinen S, Lässer C, Lener T, Ligeti E, Linē A, Lipps G, Llorente A, Lötvall J, Manček-Keber M,

Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Hoen ENMN-‘t, Nyman TA, O’Driscoll L, Oliván M, Oliveira C, Pállinger É, Portillo HA del, Reventós J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sánchez-Madrid F, Santarém N, Schallmoser K, Ostefeld MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Grein SG Van der, Vasconcelos MH, Wauben MHM, Wever O De. 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 4(2015):1–60.

Yates AG, Pink RC, Erdbrügger U, Siljander PR, Dellar ER, Pantazi P, Akbar N, Cooke WR, Vatish M, Dias-Neto E, Anthony DC, Couch Y. 2022. In sickness and in health: The functional role of extracellular vesicles in physiology and pathology in vivo: Part II: Pathology. *J Extracell Vesicles* 11(1).

Yu L, Tu Y, Jia X, Fang K, Liu L, Wan L, Xiang C, Wang Y, Sun X, Liu T, Yu D, Cao W, Song Y, Fan Y. 2017. Resveratrol protects against pulmonary arterial hypertension in rats via activation of silent information regulator 1. *Cell Physiol Biochem* 42(1):55–67.

Yu Q, Chan SY. 2017. Mitochondrial and Metabolic Drivers of Pulmonary Vascular Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension. *Adv Exp Med Biol* 967:373.

Yu Q, Dong L, Li Y, Liu G. 2018. SIRT1 and HIF1 α signaling in metabolism and immune responses. *Cancer Lett* 418:20–26.

Zelt JGE, Chaudhary KR, Cadete VJ, Mielniczuk LM, Stewart DJ. 2019. Medical Therapy for Heart Failure Associated with Pulmonary Hypertension. *Circ Res* 124(11):1551–1567.

Zhang S, Liu X, Ge LL, Li K, Sun Y, Wang F, Han Y, Sun C, Wang J, Jiang W, Xin Q, Xu C, Chen Y, Chen O, Zhang Z, Luan Y. 2020a. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes improve pulmonary hypertension through inhibition of pulmonary vascular remodeling. *Respir Res* 21(1).

Zhang Z, Ge LL, Zhang S, Wang J, Jiang W, Xin Q, Luan Y. 2020b. The protective effects of MSC-EXO against pulmonary hypertension through regulating Wnt5a/BMP signalling pathway. *J Cell Mol Med* 24(23):13938.

Zhou S, Li MT, Jia YY, Liu JJ, Wang Q, Tian Z, Liu YT, Chen HZ, Liu DP, Zeng XF. 2015. Regulation of Cell Cycle Regulators by SIRT1 Contributes to Resveratrol-Mediated Prevention of Pulmonary Arterial Hypertension. *Biomed Res Int* 2015.

Zhu L, Sun HT, Wang S, Huang SL, Zheng Y, Wang CQ, Hu BY, Qin W, Zou TT, Fu Y, Shen XT, Zhu WW, Geng Y, Lu L, Jia H liang, Qin LX, Dong QZ. 2020. Isolation and characterization of exosomes for cancer research. *J Hematol Oncol* 2020 13(1):1–24.

Zolty R. 2021. Novel Experimental Therapies for Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Exp Pharmacol* 13:817.

Zurlo G, Piquereau J, Moulin M, Pires Da Silva J, Gressette M, Ranchoux B, Garnier A, Ventura-Clapier R, Fadel E, Humbert M, Lemaire C, Perros F, Veksler V. 2018. Sirtuin 1 regulates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation: Role in pulmonary arterial hypertension. *J Hypertens* 36(5):1164–1177.