

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Cristiano Urbano Becker

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO
NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL
PULMONAR**

Porto Alegre

2013

Cristiano Urbano Becker
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO
NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL
PULMONAR**

Orientadora: Professora Doutora Adriane Belló-Klein
Co-orientadora: Doutora Carmem Luiza Sartório

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em ciências Biológicas,
área de concentração: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas –
Fisiologia.

Porto Alegre
2013

**"Entre mim e a vida há um vidro ténue. Por mais nitidamente que eu veja e
compreenda a vida, eu não lhe posso tocar."**

Fernando Pessoa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a minha mãe, maior incentivadora de meus estudos e presente em todos os momentos importantes de minha vida.

Agradeço a minha orientadora Adriane Belló-Klein, que não apenas cumpriu bem seu papel, mas também foi uma grande amiga, consoladora em momentos difíceis, apoiando-me em decisões importantes.

Agradeço a minha co-orientadora Carmem Luíza Sartório, que, além de saber trabalhar de forma alegre e ser uma excelente pesquisadora, ajudou-me em etapas cruciais do meu projeto, ensinando-me muito.

Agradeço ao Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, que permitiu a realização do meu projeto, oferecendo todos os seus recursos disponíveis.

Agradeço a todas as pessoas do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, as que passaram e as que se mantêm, pelo companheirismo no trabalho, apoio e amizade construídos.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, por ter me recebido e permitido a realização deste Mestrado.

Agradeço, em especial, aos amigos do laboratório Rafael Colombo e Rafaela Siqueira, por terem estado sempre muito envolvidos com meu trabalho, sem os quais eu não o teria concluído, e pela grande amizade que construímos e que pretendo levar durante toda a minha vida.

Agradeço aos meus demais amigos, que souberam entender a minha ausência nos últimos anos e me apoiaram nas decisões que eu tomei desde o início do Mestrado, o qual hoje, muito feliz, concluo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação clínica da hipertensão pulmonar atualizada (Dana Point, 2008);

Tabela 2 - Classificação funcional da hipertensão pulmonar;

Tabela 3 - Massa corporal dos animais (g);

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Redução monovalente do oxigênio, provocando a formação de espécies reativas de oxigênio. Adaptado de SMITH, C. e cols, 2ª Ed., 2007.

Figura 2. Ação dos antioxidantes sobre as espécies reativas de oxigênio.

Figura 3. Cronograma Experimental.

Figura 4. Pressão ventricular sistólica direita (PSVD), em mmHg.

Figura 5. Pressão ventricular diastólica final direita (PDFVD), em mmHg.

Figura 6. Índice de hipertrofia cardíaca (massa do coração/massa corporal), em mg/g.

Figura 7. Índice de hipertrofia do ventrículo direito (massa do VD/massa corporal), em mg/g.

Figura 8. Índice de hipertrofia do ventrículo direito (massa do VD/massa do coração), em mg/mg.

Figura 9. Índice de hipertrofia do ventrículo direito (massa do VD/comprimento da ítiba), em mg/mm.

Figura 10. Massa corporal dos animais, em gramas, ao longo do tempo.

Figura 11. Ganho de massa corporal dos animais, em porcentagem, ao longo do tempo.

Figura 12. Concentração de H_2O_2 (pmol/mg prot.) em homogeneizado de gastrocnêmio.

Figura 13. Atividade da superóxido dismutase (U/mg prot.) em homogeneizado

de gastrocnêmio.

Figura 14. Expressão proteica da superóxido dismutase, em unidades arbitrárias, em homogeneizado de gastrocnêmio.

Figura 15. Atividade da catalase (pmol/mg prot.) em homogeneizado de gastrocnêmio.

Figura 16. Expressão proteica da catalase, em unidades arbitrárias, em homogeneizado de gastrocnêmio.

Figura 17. Atividade da glutaciona peroxidase (GPx.), em picomol/min/mgprot., em homogeneizado de gastrocnêmio.

Figura 18. Atividade da glutaciona redutase (GR), em picomol/min/mgprot., em homogeneizado de gastrocnêmio.

Figura 19. Relação da glutaciona total pela oxidada, em homogeneizado de gastrocnêmio.

Figura 20. Expressão proteica da glutaciona S-transferase, em unidades arbitrárias, em homogeneizado de gastrocnêmio.

Figura 21. Quimiluminescência (cps/mg prot.) em homogeneizado de gastrocnêmio.

Figura 22. Esquema de alterações do sistema antioxidante no grupo controle treinado.

Figura 23. Esquema de alterações do sistema antioxidante no grupo monocrotalina sedentário.

Figura 24. Esquema de alterações do sistema antioxidante no grupo

monocrotalina treinado.

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CAT	Catalase
CS	Controle Sedentário
CT	Controle Treinado
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GR	Glutaciona Redutase
GPx	Glutaciona Peroxidase
GSH	Glutaciona Reduzida
GSSG	Glutaciona Oxidada
GST	Glutaciona S-Transferase
HAP	Hipertensão Arterial Pulmonar
HP	Hipertensão Pulmonar
IC	Insuficiência Cardíaca
IHC	Índice de Hipertrofia Cardíaca
MCT	Monocrotalina
MS	Monocrotalina Sedentário
MT	Monocrotalina Treinado
PDFVD	Pressão Diastólica Final Ventricular Direita
PSVD	Pressão Sistólica Ventricular Direita
QL	Quimiluminescência
RL	Radicais Livres
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
SOD	Superóxido Dismutase
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VD	Ventrículo Direito

RESUMO

A hipertensão arterial pulmonar afeta milhares de pessoas ao redor do mundo anualmente, causando, a longo prazo, insuficiência cardíaca direita e morte. Em alguns estudos já foi demonstrado que a hipertensão arterial pulmonar está relacionada com altos níveis de estresse oxidativo. Estratégias que possibilitem diminuir o estresse oxidativo, como o exercício, podem ser importantes adjuvantes no tratamento dessa doença.

Poucos estudos até o momento relacionaram a tríade hipertensão arterial pulmonar, estresse oxidativo e exercício físico. Desses, todas as análises foram feitas no músculo cardíaco. Considerando que a baixa capacidade de realizar exercício físico é uma característica bastante presente nessa doença, esse estudo foi feito com o objetivo de avaliar o estresse oxidativo na musculatura esquelética (gastrocnêmio) de ratos com hipertensão arterial pulmonar submetidos a um treinamento físico aeróbio.

Os resultados deste trabalho mostraram que os animais sedentários que receberam monocrotalina apresentaram hipertrofia ventricular direita e aumento de pressões ventriculares sistólica e diastólica final direita. Além disso, a monocrotalina aumentou as pressões sistólica e diastólica do ventrículo direito, conseguindo o exercício diminuir significativamente a pressão diastólica ao final do protocolo. Esses dados hemodinâmicos sugerem que o modelo de hipertensão pulmonar foi estabelecido nesse trabalho. Em relação ao estresse oxidativo, no músculo gastrocnêmio, ocorreu um aumento de produção de peróxido de hidrogênio, acompanhado de um aumento da expressão de SOD, sem a compensação de enzimas antioxidantes que o removessem, como catalase e GPx. Mais do que isso, a atividade da GPx diminuiu nesse grupo. Essa resposta pode ser determinante para a presença de dano lipídico, também observado nesse grupo. Tratando-se da relação GSH/GSSG, não foram observadas diferenças significativas bem como na atividade da GR. Por fim, apenas esse grupo mostrou aumento de GST, sugerindo que glutathione está sendo consumida para metabolizar a monocrotalina injetada.

Em relação aos animais submetidos à administração de monocrotalina que treinaram, embora a produção de peróxido de hidrogênio também estivesse aumentada, um acréscimo na expressão proteica e na atividade da catalase foi

observado bem como um aumento da atividade da GPx. A presença dessa compensação do sistema antioxidante pode ter contribuído para evitar a lipoperoxidação no gastrocnêmio desses animais, apesar da concentração elevada de peróxido de hidrogênio. Assim como no outro grupo, a SOD apresentou-se elevada, explicando o aumento de peróxido de hidrogênio e não foram observadas diferenças na relação GSH/GSSG bem como na atividade da GR.

Esses dados em conjunto mostram que o exercício físico, apesar de não diminuir a concentração de peróxido de hidrogênio produzida no músculo gastrocnêmio dos animais que possuem hipertensão arterial pulmonar, foi capaz de induzir uma adaptação antioxidante eficiente que evitou o dano lipídico às células desse tecido - outrora observado nos animais sedentários. Essa é uma resposta altamente benéfica para a presente população, sugerindo que o estresse oxidativo está envolvido com a disfunção muscular presente na musculatura esquelética. Nesse sentido, futuras investigações devem ser realizadas a fim de melhor entendermos os mecanismos moleculares através dos quais o exercício modula essa resposta, contribuindo para uma melhor qualidade de vida na população que apresenta hipertensão arterial pulmonar.

ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension affects thousands of people around the world annually, causing right heart failure and death. In some studies it has been shown that pulmonary arterial hypertension is associated with high levels of oxidative damage. Strategies that allow reducing oxidative stress, as exercise training, may be important adjuvants in the treatment of this disease.

Few studies until now have related the triad pulmonary arterial hypertension, oxidative stress and exercise. Of these, all analyzes were done to cardiac muscle. Whereas the low ability to perform physical exercise is an important characteristic present in this disease, this study was done to evaluate oxidative stress in skeletal muscles (gastrocnemius) of rats with pulmonary hypertension undergoing aerobic training.

The results of the study showed that the monocrotaline-sedentary animals had ventricular hypertrophy and right ventricular systolic and end-diastolic pressures increased. Moreover, monocrotaline increased systolic and diastolic right ventricular pressures, and the exercise was able to decrease significantly the diastolic pressure at the end of the protocol. These hemodynamic data suggest that the model of pulmonary hypertension was well established in this work. In relation to oxidative stress in gastrocnemius muscle, there was a higher production of hydrogen peroxide, accompanied by an increased expression of SOD, without compensation of antioxidant enzymes such as catalase and GPx. Moreover, the GPx activity decreased in this group. This response may be crucial to the presence of lipid damage, also observed in this group. In the case of GSH / GSSG, no significant differences were observed as well as in GR activity. Finally, only this group showed an increase in GST, suggesting that glutathione is being consumed to metabolize injected monocrotaline.

For monocrotaline-trained animals, although the production of hydrogen peroxide was also increased, a raise in protein expression and activity of catalase was observed as well as an increase in GPx activity. The presence of the antioxidant system compensation may have contributed to prevent lipid peroxidation in the gastrocnemius of these animals, despite the high concentration of hydrogen peroxide. As in the other group, SOD appeared high, explaining the increase of

hydrogen peroxide and no differences were observed in the GSH / GSSG as well as in GR activity.

These data together show that physical training, although not decrease the concentration of reactive oxygen species produced in the gastrocnemius muscle of animals with pulmonary hypertension, was able to induce an efficient adaptation antioxidant which prevented damage to the cells of that tissue lipid - previously observed in sedentary animals. This is an answer highly beneficial for this population, suggesting that oxidative stress is involved in muscle dysfunction present in skeletal muscle. Accordingly, future research should be conducted to better understand the molecular mechanisms by which exercise modulates this response, contributing to a better quality of life in the population that develops pulmonary arterial hypertension

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	27
2.1 Problema de Pesquisa.....	27
2.2 Hipótese.....	27
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivos Específicos.....	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Animais.....	29
4.2 Cálculo Amostral.....	29
4.3 Grupos Experimentais.....	29
4.4 Protocolo Experimental.....	30
4.5 Protocolo de Treinamento.....	31
4.6 Considerações Éticas na vivisseccão dos animais.....	32
4.7 Avaliação da doença.....	32
4.7.1 Avaliação Hemodinâmica.....	32
4.7.2 Hipertrofia Cardíaca.....	33
4.7.3 Massa Corporal.....	33
4.8 Análise do Estresse Oxidativo.....	33
4.8.1 Medida da concentração de peróxido de hidrogênio.....	34
4.8.2 Atividade da Superóxido Dismutase.....	34
4.8.3 Atividade da Catalase.....	35
4.8.4 Atividade da Glutathione Peroxidase.....	35
4.8.5 Atividade da Glutathione Redutase.....	36
4.8.6 Relação GSH/GSSG.....	36
4.8.7 Lipoperoxidação por quimiluminescência.....	36
4.8.8 Análise da expressão protéica por western blot.....	37
4.8.9 Quantificação de proteína.....	38
4.10 Análise Estatística.....	38
4.11 Grau de Severidade dos procedimentos.....	39

5 RESULTADOS.....	40
5.1 Avaliação da Hipertensão Pulmonar.....	40
5.1.1 Avaliação Cardíaca.....	40
5.1.1.1 Registro de pressão ventricular.....	40
5.1.1.2 Hipertrofia Cardíaca e do Ventrículo Direito.....	41
5.1.2 Massa Corporal.....	44
5.2 Análise do Estresse Oxidativo.....	46
5.2.1 Concentração de peróxido de hidrogênio.....	46
5.2.2 Atividade da Superóxido Dismutase.....	47
5.2.3 Expressão da Superóxido Dismutase.....	47
5.2.4 Atividade da Catalase.....	48
5.2.5 Expressão da Catalase	49
5.2.6 Atividade da Glutaciona Peroxidase.....	50
5.2.7 Atividade da Glutaciona Redutase.....	50
5.2.8 Relação GSH/GSSG.....	51
5.2.9 expressão da Glutaciona S-Transferase.....	52
5.2.10 Lipoperoxidação por quimiluminescência.....	52
6 DISCUSSÃO.....	54
7 CONCLUSÕES.....	66
7REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão pulmonar (HP) é definida como uma pressão arterial pulmonar média acima de 25mmHg em repouso ou acima de 30mmHg durante o exercício físico (Budev et al., 2003). Entre suas características histológicas, podemos observar um aumento da proliferação da camada íntima, um espessamento da camada média e, em última instância, lesões nas vasculatura da artéria pulmonar (Deng et al, 2000). Devido a essas modificações, observa-se uma elevação da resistência vascular, seguida de um aumento da pressão do ventrículo direito, o que, por sua vez, leva à hipertrofia dessa câmara e a um quadro de insuficiência cardíaca direita (Redout et al., 2009).

Nesse sentido, A HP surge como uma doença fatal, sem causas específicas ou, então, devida a uma variedade de fatores que a predispõe (Simonneau et al, 2009). Para melhor compreender esses elementos, a classificação mais atual da HP, apresentada no 4º Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar, em 2008, em Dana Point, sugere a divisão dessa doença em cinco grandes grupos quanto à sua etiologia listados na Tabela 1:

Tabela 1 - Classificação clínica da hipertensão pulmonar atualizada (Dana Point, 2008).

- 1. Hipertensão Arterial Pulmonar**
 - 1.1. HAP Idiopática;**
 - 1.2. Hereditária**
 - 1.2.1. BMPR2;**
 - 1.2.2. ALK 1, endoglina;**
 - 1.2.3. Causas desconhecidas;**
 - 1.3. Induzida por drogas e toxinas;**
 - 1.4. Associada com**
 - 1.4.1. Doenças do tecido conectivo;**
 - 1.4.2. Infecção por HIV;**
 - 1.4.3 Hipertensão Portal;**
 - 1.4.4 Insuficiência Cardíaca Congênita;**
 - 1.4.5. Esquistossomose;**

- 1.4.6. Anemia hemolítica crônica;**
- 1.5. Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido;**
- 2. Hipertensão Pulmonar associada a doenças do coração esquerdo**
 - 2.1. Disfunção sistólica;**
 - 2.2. Disfunção diastólica;**
 - 2.3. Doença valvular;**
- 3. Hipertensão pulmonar associada com doenças pulmonares e / ou hipoxemia**
 - 3.1. Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC);**
 - 3.2. Doença pulmonar intersticial;**
 - 3.3. Outras doenças pulmonares com padrões restritivos e obstrutivos misturados;**
 - 3.4. Distúrbios respiratórios do sono;**
 - 3.5. Distúrbios de hipoventilação alveolar;**
 - 3.6. Exposição crônica a grandes altitudes;**
 - 3.7. Anomalias do desenvolvimento pulmonar;**
- 4. Hipertensão pulmonar devido a trombose crônica e / ou embólica**
- 5. Hipertensão pulmonar com mecanismos multifatoriais não claros**
 - 5.1. Desordens hematológicas;**
 - 5.2. Desordens sistêmicas;**
 - 5.3. Desordens metabólicas;**
 - 5.4. Outros.**

Adaptada de SIMMONEAU et al., Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension, *Journal of the American College of Cardiology*, Vol.54; No.1, Supplement S, 2009.

Ainda que seja uma doença incomum, a hipertensão pulmonar afeta milhares de pessoas ao redor do mundo e é uma doença extremamente fatal, com uma taxa de mortalidade de 58% dentro de 3 anos após o seu diagnóstico (HUMBERT et al., 2010). A incidência estimada de hipertensão arterial pulmonar idiopática é de 1 a 2 casos por milhão na população em geral. Durante a infância, a condição afeta ambos os gêneros igualmente. Após a puberdade, é mais comum em mulheres do que em homens (razão de 1,7 para 1). Além disso, a hipertensão arterial pulmonar é

mais prevalente em pessoas de 20 a 40 anos de idade e a condição não tem predileção racial (RUBIN, 1997).

Em relação às outras classificações da hipertensão pulmonar, a incidência é relativamente comum, mas ainda não diagnosticada. Estimativas reais da prevalência dessas condições são difíceis de se obterem pela alta diversidade de causas identificáveis (NAUSER et al., 2001).

Os principais sintomas iniciais observados na hipertensão pulmonar incluem dispnéia assim como fadiga muscular, disfunção esquelética, fraqueza, dor no peito e síncope. Além disso, indivíduos com HAP relatam uma redução significativa na qualidade de vida e demonstram uma intolerância ao exercício físico de moderada à severa (CALLAHAN e TOTH, 2013). A dispnéia e a intolerância ao exercício são devidas à dificuldade nas trocas gasosas associadas a um desequilíbrio na relação ventilação/perfusão, assim como a um reduzido retorno venoso com subsequente redução do débito cardíaco.

A presença e a severidade desses sintomas são tão relevantes que, após uma padronização de uma classificação funcional para pacientes com insuficiência cardíaca desenvolvida pela Associação do Coração de Nova Iorque, uma classificação funcional foi desenvolvida para permitir comparações dos pacientes em relação à severidade clínica com o progresso da hipertensão pulmonar (LIBBY et al., 2007). Apesar disso, uma ênfase maior tem se mantido para o estudo da fisiopatologia pulmonar e cardíaca da doença em detrimento das alterações na musculatura esquelética dessa população, o que contribui, por exemplo, para um menor entendimento dos mecanismos que geram atrofia e fadiga muscular nesses pacientes.

Tabela 2 - Classificação funcional da hipertensão pulmonar

Classe I - Pacientes com hipertensão pulmonar, mas sem nenhuma limitação de atividade física. Atividade física diária não causa dispnéia ou fadiga indevida, dor no peito ou síncope.
Classe II - Pacientes com hipertensão pulmonar, resultando em limitação leve de atividade física. Sentem-se confortáveis em repouso. Atividade física diária causa dispnéia ou fadiga indevida, dor no peito ou síncope.

Classe III - Pacientes com hipertensão pulmonar resultando em limitação da atividade física. Eles são confortáveis em repouso. Menos que atividades diárias causam dispnéia ou fadiga indevida, dor torácica ou síncope.

Classe IV - Pacientes com hipertensão pulmonar com incapacidade de realizar qualquer atividade física sem que haja sintomas. Esses pacientes manifestam sinais de insuficiência cardíaca direita. Dispnéia e /ou fadiga podem estar presentes mesmo em repouso. O desconforto é aumentado por qualquer atividade física.

Adaptado de Rich S. Executive summary from the World Symposium on Primary Pulmonary Hypertension, Evian, France, September 6-10, 1998, co-sponsored by The World Health Organization.

Em pessoas com mais de 50 anos de idade, a *Cor Pulmonale*, conseqüência de uma hipertensão pulmonar não tratada, é a terceira maior desordem cardíaca – perdendo para doença coronariana e hipertensão arterial sistêmica (PALEVSKY e FISHMAN, 1990). *Cor Pulmonale*, é um termo definido pela Organização Mundial de Saúde como uma síndrome, caracterizada pela hipertrofia do ventrículo direito, resultante de doenças que afetam a função e/ou a estrutura dos pulmões, como é o caso da hipertensão pulmonar, exceto quando as alterações pulmonares são secundárias a doenças que afetam o lado esquerdo do coração ou a cardiopatias congênitas (WHO, 1963).

A presença de hipertensão pulmonar com *Cor Pulmonale* geralmente está associada a um pior prognóstico, independente da doença de base. A sobrevida estimada, na presença de *Cor pulmonale*, é de 45% em dois anos, contra 69% na sua ausência (MACNEE, 1992).

Modelos experimentais de hipertensão pulmonar têm sido criados e caracterizados para estudar e entender seus mecanismos. Pesquisas realizadas têm o intuito de prevenção e tratamento das manifestações clínicas que culminam com a insuficiência cardíaca, pois esta doença permanece sendo responsável por um alto índice de morbidade e mortalidade da população mundial (LUDKE, 2007).

Entre os modelos experimentais de HP, amplamente utilizado é o modelo de monocrotalina (MCT), que produz hipertensão pulmonar, seguida de sobrecarga de pressão no ventrículo direito, hipertrofia ventricular direita e, eventualmente, insuficiência cardíaca congestiva (PAN et al., 1993). Uma única injeção

intraperitoneal (60-90mg/kg) de MCT em ratos produz, entre a segunda e terceira semanas subseqüentes, características clínicas que se assemelham à HAP idiopática (JASMIN et al., 2003).

A monocrotalina é um alcalóide pirrolizidínico encontrado nas plantas da espécie *Crotalaria spectabilis*. Quando ingerida, sofre metabolização no fígado, através do sistema citocromo P450 monooxigenase, convertendo-se à dehidromonocrotalina, que então circula para o parênquima pulmonar (MONNET E CHACHQUES, 2005).

A lesão inicial leva a um aumento da permeabilidade capilar, edema intersticial moderado, fibrose, acúmulo de macrófagos, modificação de pneumócitos II e edema alveolar (WILSON et al., 1992). Tais lesões também resultam em degeneração endotelial ou hiperplasia, hipertrofia da musculatura lisa e edema adventício. Essas mudanças geram como conseqüência um aumento da resistência vascular pulmonar e carga de pressão sobre o ventrículo direito (MONNET E CHACHQUES, 2005).

Alguns estudos (PICHARDO et al., 1999; JONG et al., 2000; FARAHMAND et al., 2004) vêm demonstrando em modelos experimentais de *Cor Pulmonale* a participação do estresse oxidativo nos diferentes estágios de desenvolvimento tanto de hipertrofia cardíaca, como de insuficiência cardíaca (IC).

O estresse oxidativo é definido classicamente como um desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e de defesas antioxidantes, em favor do primeiro, podendo levar à lesão tecidual e contribuindo para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca tanto em humanos (KAUL, 1993) como em modelos experimentais (KAUL et al., 1993 e HILL et al., 1996).

A oxidação é parte fundamental da vida e do metabolismo aeróbio (BARREIROS et al., 2006). A geração de energia necessária ao metabolismo celular ocorre essencialmente na cadeia respiratória mitocondrial. Durante este processo, a molécula de oxigênio é reduzida até ser transformada em água. A redução completa de uma molécula de oxigênio requer quatro elétrons, ocorrendo através do sistema citocromo oxidase (DEL MAESTRO, 1980).

No processo de redução do oxigênio, cerca de 3 a 5% do oxigênio que entra nesta organela, recebe os quatro elétrons, porém cada um separadamente, formando uma série de elementos tóxicos e reativos, as espécies reativas de

oxigênio (EROs), tais como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}) (MENEZHINI, 1987). As EROs podem ser produzidas em quase todos os tipos de células, incluindo células endoteliais, musculares lisas, cardiomiócitos e células da musculatura esquelética (SUKHANOV et al., 2011).

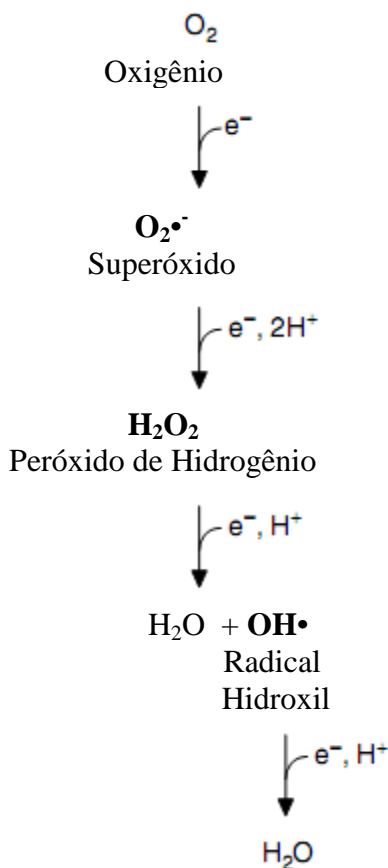


Figura 1. Redução monovalente do oxigênio, provocando a formação de espécies reativas de oxigênio. Adaptado de SMITH, C. e cols., 2ª Ed., 2007.

Além das EROs, existem também outras espécies reativas derivadas de enxofre, carbono e nitrogênio, sendo algumas delas o radical triclorometil (CCl_3^{\bullet}), o óxido nítrico (NO^{\bullet}), os nitritos (NO_2^-), os nitratos (NO_3^-) e os peroxinitritos ($ONOO^-$).

Algumas dessas espécies, quando já não o são, podem gerar radicais livres. Denomina-se radical livre qualquer espécie química (átomo ou molécula) capaz de existir independentemente, que possua um ou mais elétrons desemparelhados em qualquer orbital, normalmente no orbital mais externo (DEL MAESTRO, 1980; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999). É importante ressaltar que nem todas as

EROs, assim como as derivadas de outras moléculas são radicais livres. Embora sejam bastante instáveis, não apresentam elétrons desemparelhados em seu orbital, como é o caso do peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Pelo fato de os radicais livres poderem ser altamente reativos e instáveis, sua interação com elementos biológicos como aminoácidos, carboidratos, DNA e lipídios de membrana levam, na maioria dos casos, a lesões irreversíveis nestas estruturas. Um único evento iniciado por um radical livre pode ser propagado e causar danos a múltiplas moléculas (JONES, 2008). Os danos mais graves são aqueles causados ao DNA e RNA. Se a cadeia do DNA é quebrada, pode ser reconectada em outra posição, alterando, assim, a ordem de suas bases. Uma enzima que tenha seus aminoácidos alterados pode perder sua atividade ou, ainda, assumir atividade diferente (BARREIROS et al., 2006).

Na tentativa de minimizar ou até mesmo inibir os efeitos deletérios dessas espécies, o nosso organismo possui um complexo e bastante eficiente sistema de defesa antioxidante. De acordo com HALLIWELL (2000), “Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente sua oxidação”.

Os mecanismos de ação dos antioxidantes são diversos. A primeira, impedindo a produção de espécies reativas de oxigênio. A segunda, através da remoção dessas moléculas presentes no meio. A terceira, impedindo a propagação do dano promovido por essas espécies, induzindo um aumento da geração de antioxidantes endógenos, atuando como sequestradoras, removendo essas espécies, ou como antioxidantes de reparo, entre outros mecanismos. Na maioria das vezes, ocorre uma integração funcional de vários destes componentes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Os agentes antioxidantes podem agir enzimaticamente, a exemplo da glutathiona peroxidase (GPx), da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) ou de forma não-enzimática, a exemplo da glutathiona reduzida (GSH) (FINKEL, 2000). Os mecanismos de ação dos sistemas antioxidantes podem ser melhor compreendidos através da figura 1.3.

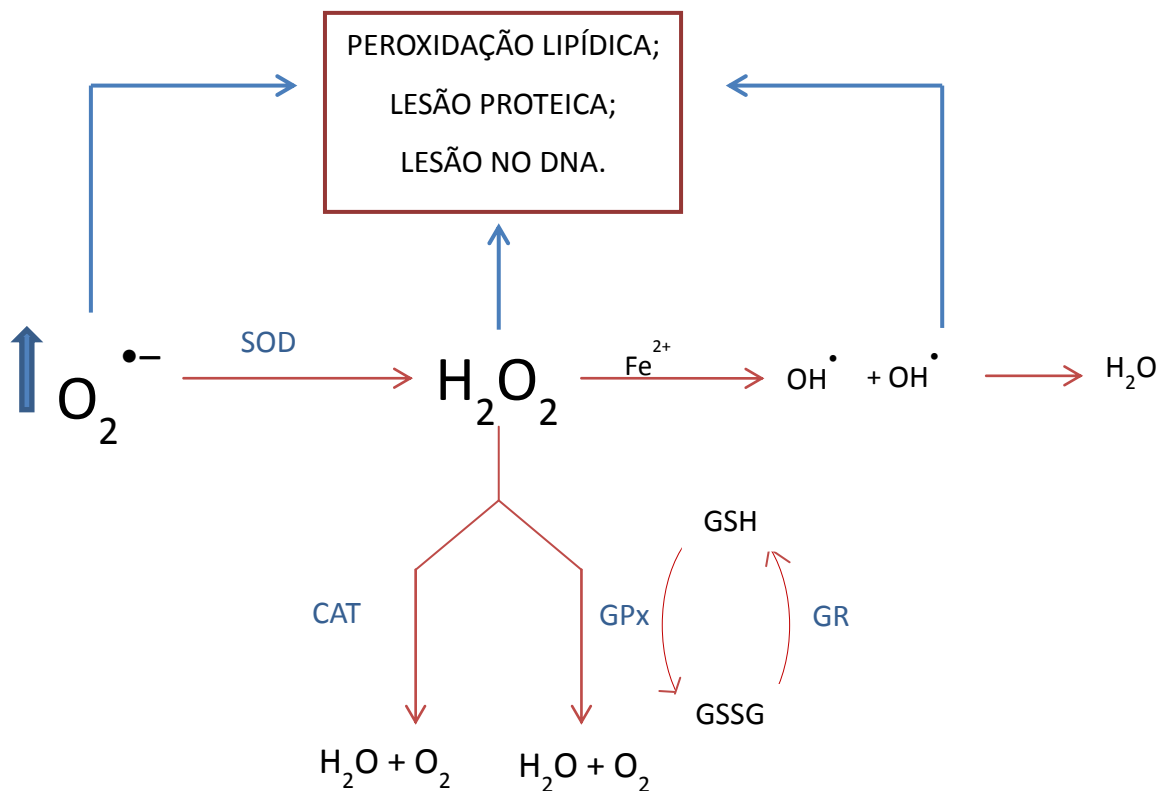


Figura 2. Ação dos antioxidantes sobre as espécies reativas de oxigênio.

O estresse oxidativo é um marcador comum em diversas condições patológicas severas, tais como insuficiência cardíaca crônica, aterosclerose, diabetes e câncer (KANETO et al., 2010). Estudos recentes apontam o estresse oxidativo como um mediador da hipertensão pulmonar e das mudanças patológicas associadas à vasculatura pulmonar e ao ventrículo direito (DeMarco et al., 2010). Em um estudo desenvolvido por Farahmand e colaboradores (2004), mudanças no estresse oxidativo no coração de ratos Wistar tratados com MCT foram acompanhadas nos períodos de uma, duas e seis semanas. Eles observaram que, nas primeiras semanas, em especial na segunda, ocorreu um aumento significativo de enzimas antioxidantes no coração desses animais, acompanhado de uma hipertrofia compensada. Já na sexta semana, observou-se uma diminuição significativa dessas enzimas, juntamente com anormalidades tanto na função sistólica, como na diastólica do ventrículo direito. Esses resultados sugerem, portanto, que o estresse oxidativo pode estar altamente envolvido na patogênese da

disfunção ventricular direita em ratos com hipertensão pulmonar, tendo os antioxidantes um grande papel na preservação da função cardíaca.

Percebendo isso, estratégias terapêuticas que promovam uma maior produção de antioxidantes, diminuindo o desequilíbrio redox, seriam importantes ferramentas benéficas no tratamento da vasculatura pulmonar, atuando como adjuvantes no tratamento de pacientes com hipertensão arterial pulmonar (DeMarco, 2010).

Dentre essas estratégias podem ser citadas fármacos, antioxidantes exógenos, como vitamina E, e exercício físico. O exercício físico é uma proposta bastante interessante por ser passível de baixo custo e de fácil acesso à população.

A relação do exercício com o estresse oxidativo é largamente descrita na literatura. O aumento do consumo de oxigênio, assim como a ativação de vias metabólicas específicas durante ou após o exercício, resulta na formação de radicais livres (RL) numa taxa cerca de 20 vezes a mais do que em relação ao repouso (DAVIES et al., 1982; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999; PINHO et al., 2006). Portanto, atividades físicas como corrida, ciclismo e natação podem causar produção de RL tanto em humanos (AGUILÓ et al., 2005) como em modelos experimentais (KAYATEKIN et al., 2002).

Entretanto, ainda que o estado oxidativo aumente durante o exercício físico, há relatos de que, a longo prazo, ocorre ativação e aumento na síntese de sistemas antioxidantes, assim como uma diminuição na produção de agentes oxidantes. Isto sugere, portanto, que o treinamento físico pode apresentar como efeito crônico uma diminuição do estado oxidativo (TERBLANCHE, 2000; KOJDA e HAMBRECHT, 2005). Tais adaptações podem ser benéficas ao indivíduo, mesmo em situações que não envolvam o exercício, ou seja, durante o repouso.

Em relação à realização de exercício físico na hipertensão arterial pulmonar, e, mais especificamente, na insuficiência cardíaca direita, até pouco tempo atrás sua recomendação era restrita, pois acreditava-se que sua prática poderia agravar as condições clínicas, particularmente piorando a disfunção do ventrículo direito (GAINE e RUBIN, 1998). Todavia, tendo em vista os conhecimentos estabelecidos da relação benéfica existente entre o exercício físico e a insuficiência cardíaca esquerda, esta linha de pesquisa, na última década, tem sido o foco de muitos estudos para um melhor entendimento da fisiopatologia da hipertensão pulmonar

sob os efeitos do exercício físico. Em pacientes com insuficiência cardíaca esquerda, intervenções com exercício, em especial com treinamento físico aeróbio de baixa intensidade, resultaram em mudanças moleculares e funcionais benéficas, incluindo melhora da função oxidativa e maior número e densidade mitocondrial (HAMBRECHT et al., 1995), aumento da expressão de fatores de crescimento derivados da insulina tipo 1 (IGF-1) (HAMBRECHT et al., 2005) e inflamação local e estresse oxidativo reduzidos (LINKE et al., 2005). Em relação à hipertensão arterial pulmonar, sabe-se que, em modelos experimentais e em humanos que se mantêm sedentários, ocorre atrofia muscular, mudança no tipo de fibra muscular, capilaridade reduzida e diminuição da capacidade oxidativa (VESCOVO et al., 1998a; VESCOVO et al., 1998b; BERNOCCHI et al., 2003). Deve-se salientar que essas alterações, adicionadas à redução da capacidade respiratória mitocondrial, são totalmente passíveis de serem melhoradas pelo treinamento físico (DAUSSIN et al., 2008).

Apesar das evidências, há ainda poucos estudos que mostram os efeitos do exercício físico a longo prazo nessa doença. Além disso, entre os que existem, ainda há controvérsias. Um estudo de Mereles et al (2006) observou que o exercício físico, associado a um treinamento respiratório, aumenta a distância no teste de 6 minutos de caminhada em pacientes com hipertensão pulmonar, sugerindo que a prática de exercícios melhoraria a qualidade de vida desses pacientes.

Por outro lado, em um estudo de HANDOKO e colaboradores (2009), em modelo experimental, foi observado que o treinamento físico pode ser benéfico quando uma dose menor de monocrotalina é administrada (considerada como HP estável), mas prejudicial quando se injeta uma alta dose dessa droga (considerada como HP progressiva), aumentando a mortalidade e o remodelamento vascular pulmonar dos ratos portadores da doença.

Em relação ao estresse oxidativo, SOUZA-RABBO e colaboradores (2008) mostraram que o exercício físico parece modular a hipertrofia do ventrículo direito e aumentar a expectativa de vida de ratos Wistar com hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina (com uma dose de 60mg/kg), estando esses resultados associados a um menor nível de estresse oxidativo. Entretanto, este é o único estudo realizado até o momento associando a tríade estresse oxidativo, monocrotalina e treinamento físico, tendo como foco principal o coração.

A partir desses estudos, percebe-se que os dados presentes na literatura ainda são bastante inconclusivos e escassos a respeito dessa tríade. Como já destacado, a disfunção esquelética e a fadiga muscular são sintomas importantes que prejudicam potencialmente a qualidade de vida dos pacientes que possuem hipertensão pulmonar.

Não existem, entretanto, até o presente momento, pesquisas que avaliem o estresse oxidativo na musculatura esquelética tanto em humanos como em modelos experimentais de hipertensão pulmonar. Além disso, menos ainda especula-se sobre os efeitos do exercício físico nesses parâmetros. A partir do nosso conhecimento, um único estudo que se aproxima da doença, encontrado na literatura, pertence à COUILLARD et al. (2003), que avaliou estresse oxidativo na musculatura do quadríceps de pacientes com DPOC submetidos a um treinamento físico. Os autores encontraram um aumento do dano lipídico nos pacientes que se exercitaram, sugerindo que uma disfunção muscular pode ocorrer em função dessa estratégia.

Percebendo a apresentação dos presentes dados, os quais mostram a escassa e inconclusiva literatura a respeito do exercício físico como adjuvante no tratamento da hipertensão arterial pulmonar, este estudo foi criado com o objetivo de analisar o efeito que um treinamento físico aeróbio provoca sobre o estado redox celular do músculo gastrocnêmio (fortemente recrutado em atividades como corrida) de ratos Wistar com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

2.1 Problema de Pesquisa

Qual o efeito de um treinamento físico aeróbio sobre o estresse oxidativo no músculo gastrocnêmio de ratos Wistar com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina?

2.2 Hipótese

Baseado nos temas que foram abordados na revisão de literatura, percebendo que a hipertensão está relacionada positivamente com o estresse oxidativo, este estudo sugere como hipótese que por promover, a longo prazo, adaptações do sistema antioxidante celular, o treinamento físico aeróbio diminui o estresse oxidativo do músculo gastrocnêmio, em ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito de um treinamento físico aeróbio, realizado 5 vezes por semana, 50 minutos por dia, durante quatro semanas, sobre o estado oxidativo do músculo gastrocnêmio de ratos Wistar com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina.

3.2 Objetivos Específicos

- Averiguar o efeito da doença e do exercício sobre o ganho de massa corporal dos animais semanalmente;
- Analisar a presença de hipertrofia do ventrículo direito e cardíaca em função da doença e do exercício;
- Avaliar as mudanças do perfil hemodinâmico, através das medidas de pressão ventricular sistólica e diastólica final do ventrículo direito;
- Analisar, no músculo gastrocnêmio, a lipoperoxidação.
- Verificar o efeito da hipertensão pulmonar e do exercício físico sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e catalase (CAT), no músculos gastrocnêmio;
- Quantificar a expressão proteica de CAT, SOD e glutathione S-transferase (GST) no músculo gastrocnêmio sob efeito da hipertensão pulmonar e do treinamento físico;
- Analisar a concentração de peróxido de hidrogênio no músculo gastrocnêmio após intervenção com exercício nos animais que receberam monocrotalina;
- Verificar a relação entre a glutathione reduzida e a glutathione oxidada no músculo gastrocnêmio em função das mesmas condições anteriores.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar pesando aproximadamente 120 gramas advindos do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram mantidos em caixas plásticas com medidas de 270 x 260 x 310 mm, contendo quatro animais por caixa. Todos os animais permaneceram em ambiente com temperatura controlada (21°C) e ciclo “claro-escuro” de 12 horas e umidade relativa de 70%. Água e ração comercial foram oferecidas “ad libitum”. A evolução da massa foi aferida semanalmente.

4.2 Cálculo Amostral

O tamanho da amostra foi calculado *a priori*. Para o cálculo da amostra foi utilizado o programa SigmaPlot 11.0, considerando-se um $\alpha=0,05$ e poder estatístico de 95% ($\beta=0,10$), constando assim uma amostra 32 ratos. A diferença mínima esperada entre as médias foi de 10%, considerando um desvio padrão de 10%. De acordo com resultados encontrados na literatura, entre os animais tratados com MCT, a taxa de mortalidade para o período de estudo, 4 semanas, gira em torno de 25%, então, nos grupos MCT sedentário e MCT treinado, ao tamanho amostral calculado foi acrescentado um animal (HENKENS et al, 2007; OKADA et al, 2008; RABBO et al, 2008).

4.3 Grupos Experimentais

Para o estudo, foram formados quatro grupos experimentais da seguinte maneira:

1. Grupo Controle Sedentário (CS) - $n= 8$ - sem administração de Monocrotalina e sem execução treinamento físico.
2. Grupo Controle Treinado (CT) - $n= 8$ - sem administração de Monocrotalina, mas submetido ao protocolo de treinamento físico.

3. Grupo Monocrotalina Sedentário (MS) - $n= 9$ - com administração de Monocrotalina, mas sem execução de treinamento físico.
4. Grupo Monocrotalina Treinado (MT) - $n= 9$ - com administração de Monocrotalina e submetido ao protocolo de treinamento físico.

4.4 Protocolo Experimental

A partir do trigésimo dia após o nascimento, os animais dos grupos controle treinado e monocrotalina treinado realizaram adaptação ao exercício físico e ao ambiente, que consistiu em duas semanas de corrida em esteira rolante adaptada. Após o término desse período, foi induzida a hipertensão arterial pulmonar por injeção de monocrotalina nos grupos MS e MT para, posteriormente, iniciar o protocolo de treinamento que consistiu em quatro semanas. Para a indução de hipertensão arterial pulmonar, com 45 dias de vida e peso corporal de aproximadamente 200 gramas, os ratos dos grupos MT e MS receberam uma única dose intraperitoneal de 60 mg/kg de monocrotalina (Sigma, crotaline - C240, USA). A diluição da MCT foi feita em 0,5 mL de HCl 0,1 N. Após a diluição, o pH foi ajustado até que atingisse o valor 7,4 com a adição de NaOH 1N. Para completar o volume final injetado foi utilizado soro fisiológico (SINGAL et al, 2000). Essa preparação corresponde para um rato de 200g, por exemplo, a uma injeção contendo 200 μ L de solução, não alterando, portanto, sua volemia. Os ratos dos grupos controle receberam dose única, contendo apenas solução salina, na mesma concentração dos grupos experimentais para passarem pela mesma situação de estresse (Tabela 3). Além disso, todos os animais permaneceram no mesmo ambiente durante o treinamento para passarem pelo mesmo processo de estresse ambiental. Além disso, os animais que não treinaram foram retirados da caixa e novamente colocados para simular o deslocamento que os animais treinados sofriam até serem postos na esteira.

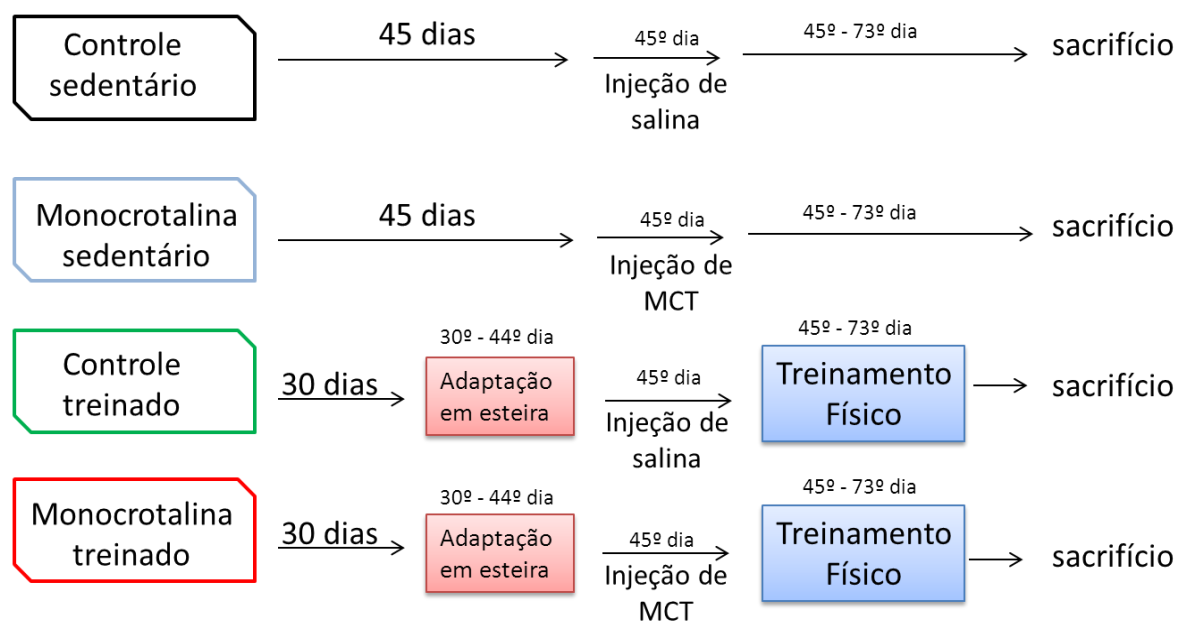


Figura 3. Cronograma Experimental

4.5 Protocolo de Treinamento

Devido à inexistência de um protocolo específico de exercício físico aeróbio para ratos com hipertensão pulmonar, o treinamento utilizado nesse estudo foi constituído de sessões de corrida em esteira adaptada (modelo TK 01, IMBRAMED) segundo protocolo pré-estabelecido para ratos Wistar com cardiopatia (RODRIGUES et al, 2007), sendo a freqüência de cinco vezes por semana (segunda à sexta), durante o período de quatro semanas após a injeção da monocrotalina. Baseando-se nesse protocolo, foram realizados dois testes de velocidade máxima, um após o período de adaptação, logo antes do período de treinamento, e outro na segunda semana de treinamento. Nesse protocolo a velocidade é aumentada em 3m/min a cada três minutos até a exaustão. É considerada a velocidade máxima o estágio completado pelo animal antes da exaustão. O cálculo para a porcentagem da velocidade máxima é realizado através de uma média aritmética de todas as velocidades máximas dentro de cada grupo experimental. Tal método foi necessário devido à necessidade de utilizar as oito raias da esteira na mesma velocidade. A partir dos resultados, foi determinada a velocidade média em que os grupos de

animais deveriam correr para atingir 60% do $VO_{2m\acute{a}x}$, intensidade essa considerada como sendo predominantemente aeróbia. Ao fim das quatro semanas de treinamento, os animais foram anestesiados e sacrificados, individualmente, por deslocamento cervical após análise hemodinâmica e vinte quatro horas após a última sessão de treinamento em esteira.

4.6 Considerações éticas na vivisseção dos animais

O estudo desenvolvido seguiu a Lei 6638, de 08 de maio de 1979, que estabelece normas para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de animais, dos Princípios Éticos na Experimentação Animal, formulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, assim como aquelas contidas nos Princípios Internacionais Orientadores para a pesquisa Biomédica envolvendo Animais provenientes do Council for International Organizations of Medical Science (CIOMS) (GOLDIM, 1997). O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (18927).

4.7 Avaliação da Hipertensão Pulmonar

4.7.1 Avaliação Hemodinâmica

Os animais foram anestesiados com ketamina (90mg/kg) e xilasina (10mg/kg) e tiveram a veia jugular exposta. Uma cânula (cateter de polietileno PE-50) foi implantada e introduzida até o átrio e ventrículo direitos. A pressão sistólica ventricular direita e a pressão diastólica final ventricular direita foram monitoradas usando um transdutor de pressão (Strain-Gauge – Narco Biosystem Miniature Pulse Transducer RP-155; Houston, Texas – EUA) ligado a um amplificador de sinais (Pressure Amplifier HP 8805C). Os sinais analógicos de pressão arterial foram digitalizados (CODAS-Data Acquisition System, PC) com frequência de amostragem de 2 KHz.

4.7.2 Hipertrofia cardíaca

O índice de hipertrofia cardíaca (IHC) oferece dados quanto ao aumento de massa muscular do coração. Este dado pode ser calculado de diversas formas. No presente estudo, o IHC foi realizado através da relação entre o peso, em miligramas, do tecido cardíaco e o peso corporal do animal, em gramas. Dois índices de hipertrofia do ventrículo direito foram realizados. No primeiro, a divisão é feita entre o peso do ventrículo direito pelo peso corporal, indicando a hipertrofia dessa câmara. O segundo índice relaciona o peso do tecido cardíaco, em miligramas, pelo comprimento da tíbia, em milímetros.

4.7.3 Massa Corporal

A massa corporal dos animais, expresso em gramas, permite, de forma indireta, relacionar a progressão da doença, visto que o emagrecimento é uma característica observada em diversos estudos que utilizam o modelo de monocrotalina. Para tanto, ele foi averiguado semanalmente através da balança manual da marca Marte e expresso em gramas. No presente trabalho, a massa foi expressa de duas formas: (1) em valores absolutos, com a sua mudança ao longo do tempo e (2) em valores percentuais, com a progressão da massa em relação ao valor que foi mensurado logo antes da injeção de monocrotalina. Para a análise estatística desses dados, foi realizada ANOVA de duas vidas com medidas repetidas.

4.8 Análise do Estresse Oxidativo

Para a realização das análises de estresse oxidativo, o músculo gastrocnêmio foi homogeneizado durante 40 segundos em Ultra-Turrax. Para cada grama de músculo, foram acrescentados 5 mL de KCl (1,15%). Também foram acrescentados 10 µL de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), 100mmol/L, para cada 1 mL do homogeneizado e 15 µL de solução Triton 10% para cada 1 grama de músculo. Após, o homogeneizado foi centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm em centrífuga

refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi, então, retirado e congelado em freezer -80°C para as posteriores dosagens (LLESUY et al., 1985).

4.8.1 Medida de peróxido de hidrogênio

O método está baseado na oxidação do vermelho de fenol pelo peróxido de hidrogênio mediado pela peroxidase de rabanete, resultando num produto que absorve em 610 nm. O tecido foi incubado por 30 minutos em tampão fosfato 10 mol/L (NaCl 140 mol/L e dextrose 5 mol/L). Após centrifugação por 30 segundos a 1000 X G em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24), o sobrenadante foi coletado e adicionado na solução tampão de vermelho de fenol 0,28 mol/L e peroxidase de rabanete 8,5 U/mL. Após o intervalo de 5 minutos, foi adicionado NaOH 1N e efetuada a leitura a 610 nm. Os resultados foram expressos em nmoles de H₂O₂ por mg de proteína (PICK & KEISARI, 1980).

4.8.2 Atividade da Superóxido Dismutase

A superóxido dismutase catalisa a reação de dois ânions superóxido, com a consequente formação de peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a catalase e a glutathiona peroxidase. A técnica utilizada neste trabalho para determinação da SOD foi baseada na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção.

A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado (MARKLUND, 1985).

Para tanto, primeiramente foi efetuada uma curva padrão usando as concentrações de 0; 0,25; 0,5 e 1 unidade de SOD, através da qual foi obtida a equação da reta para realização dos cálculos. Foram adicionados solução tampão (Tris-base 50 mmol/L e EDTA 1 mmol/L, em pH 8,2), 4 µL de solução de catalase (30µmol/L), volumes adequados das soluções de SOD e 8 µL de pirogalol 24 mmol/L (em ácido clorídrico a 10 mM), obtendo-se as concentrações desejadas.

No meio de reação, foram utilizados 15 µL da amostra do músculo, previamente preparada, tampão Tris-base, 8 µL de pirogalol (24 mmol/L) e 4 µL de catalase (30µmol/L). A variação na absorbância foi acompanhada a 420 nm durante 2 minutos e os resultados expressos em U/mg de proteína.

4.8.3 Atividade da Catalase

A taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade da CAT, e obedece a uma cinética de pseudoprimeira ordem com relação a este. Desta forma, o consumo de H₂O₂ pode ser utilizado como uma medida de atividade da enzima CAT.

O ensaio consiste em medir a diminuição da absorbância no comprimento de onda de 240 nm. Para a realização das medidas foi usada uma solução tampão de fosfatos de sódio a 50 mM em pH 7,4 e peróxido de hidrogênio 0,3 mol/L. Foram adicionados 955 µL deste tampão e 10 µL de amostra na cubeta do espectrofotômetro, sendo esta mistura descontada contra um branco de tampão fosfato. A seguir foram adicionados 35 µL de peróxido de hidrogênio e a avaliou-se a diminuição da absorbância durante dois minutos no comprimento de onda selecionado. Os resultados foram expressos em pmoles por mg de proteína (BOVERIS e CHANCE, 1973).

4.8.4 Atividade da Glutathione Peroxidase

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

Para tanto, a amostra foi preparada adicionando-se uma mistura de cianetos (cianeto de potássio - KCN - 9 mmol/L e ferrocianeto de potássio - K₃[Fe(CN)₆] - 0,9 mmol/L) para inibir a atividade pseudo-peroxidase da hemoglobina, a fim de que esta não interfira no ensaio. Para a leitura em espectrofotômetro, adicionou-se 330 µL de tampão de fosfatos 143 mmol/L e EDTA 1 mmol/L (pH 7,5), 50 µL de amostra, 500 µL de NADPH (0,24 mmol/L), 10 µL de azida sódica (1 mmol/L) para inibir a atividade

da catalase, 50 μ L de GSH (5 mmol/L) e 10 μ L de glutathiona redutase (GR) 0,25 U/mL. A absorbância foi registrada por um período de 1 minuto a 340 nm, para obtenção da linha de base. Após esse momento, adicionou-se 50 μ L de hidroperóxido de tert-butila (0,5 mmol/L), e a diminuição da absorbância, devido ao consumo de NADPH, foi monitorada por aproximadamente 5 minutos. Os resultados foram expressos em nmoles/min/mg de proteína (FLOHÉ e GUNZLER, 1984).

4.8.5 Atividade da Glutathiona Redutase

A glutathiona redutase é uma flavoproteína que catalisa a redução NADPH-dependente de GSSG para GSH. Essa enzima é essencial para o ciclo redox de GSH, o qual mantém os níveis adequados de glutathiona no estado reduzido intracelular. Uma alta relação de GSH/GSSG é essencial para a proteção contra o estresse oxidativo. A atividade da GR foi determinada pela mensuração da taxa de oxidação de NADPH a 340nm. Os resultados estão expressos como unidades de enzima que catalisam a oxidação de 1 μ mol de NADPH por minuto por miligrama de proteína (CARLBERG E MANNERVICK, 1985).

4.8.6 Relação GSH/GSSG

Para determinar a glutathiona total, o homogeneizado do tecido precisou ser desproteinizado com ácido perclórico 2 mol/L e centrifugado por 10 minutos a 1000g. O sobrenadante foi neutralizado com hidróxido de potássio 2 mol/L. O meio de reação continha tampão fosfato 100 mmol/L (pH 7,2), ácido nicotinamida dinucleotídeo fosfato (NADPH) 2 mmol/L, glutathiona redutase 0,2 U/mL, ácido ditionitrobenzóico 70 μ mol/L. Na determinação da glutathiona reduzida, o sobrenadante neutralizado reagiu com ácido ditionitrobenzóico 70 μ mol/L e foi lido no espectrofotômetro a 420nm (AKERBOOM e SIES, 1981).

4.8.7 Lipoperoxidação por quimiluminescência

O método de quimiluminescência consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética ao homogeneizado de tecido, avaliando-se a

capacidade de resposta produzida pela amostra. A realização deste tipo de teste consiste no fato de que os hidroperóxidos são espécies químicas bastante instáveis, reagindo com lipídios por um mecanismo radicalar que gera produtos que emitem luz pela amostra em estudo. A quimiluminescência foi medida em contador beta (LKB Rack Liquid Scintillation Spectrometer). O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistia em 2mL de uma solução reguladora de KCl 140 mmol/L, fosfatos 20 mmol/L, (pH 7,4), na qual foi adicionado 50 µL de amostra. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps), por miligrama de proteína segundo Gonzalez-Flecha et. al (1991).

4.8.8 Análise da expressão protéica por western blot

Foram carregados 100 µg de proteína por poço para a eletroforese de gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema usando géis separadores com densidade de 14% e 10%. As proteínas foram transferidas para uma membrana PVDF (Immobilon –P, Millipore) usando tampão contendo Tris base 48 mmol / L, glicina 39 mmol / L, metanol 10%, pH=8,9. Em seguida, as membranas foram bloqueadas por uma hora em solução de leite desnatado 1% em tampão TBS-tween (Tris 20mM, NaCl 140mM, Tween 20 0,05%). Os anticorpos primários utilizados foram rabbit policlonal (AB1212, Chemicon) para Catalase, (sc- 459 [Z-5], Santa Cruz Biotechnology) para GST, e mouse monoclonal para SOD (sc-271014 [B-1] , Santa Cruz Biotechnology).

Os anticorpos primários foram detectados usando os anticorpos secundários goat anti-rabbit (Millipore) e rabbit anti-mouse (Invitrogen) e as bandas foram detectadas por quimioluminescência utilizando-se um composto tipo ECL. Os filmes autoradiográficos (marca Sinapse) foram revelados em uma câmara escura e posteriormente as imagens foram digitalizadas em um scanner (HP Deskjet F4480). e então analisadas e quantificadas utilizando-se o programa ImageJ. Os pesos moleculares das bandas de proteínas foram determinados utilizando-se um marcador de peso molecular (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). Os resultados de cada membrana foram normalizados pelo método de Ponceau e expressos em densidades ópticas em pixels (KLEIN et al, 1995).

4.9 Quantificação de Proteína

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores (1951), que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1mg/mL. Reagentes utilizados: Reativo de Follin Ciocalteau, diluído em água destilada na proporção 1:3, e Reativo C, que é composto por 50mL do reativo A, 0,5mL do reativo B1 e 0,5mL do reativo B2, onde os reativos A, B1 e B2 são, respectivamente: NaHCO_3 (bicarbonato de sódio) 2% (p/v) em NaOH (hidróxido de sódio) 0,1N; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre) 1% (p/v); $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (tartarato de sódio e potássio) 2% (p/v). A medida foi efetuada em espectrofotômetro a 625 nm e os resultados expressos em mg/mL.

4.10 Análise Estatística

Com base nos resultados obtidos, foram calculadas as médias e os desvios padrões da média para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados.

Foi utilizado o teste de Bartlett, para avaliar o comportamento paramétrico ou não-paramétrico dos dados. A avaliação da normalidade (distribuição Gaussiana) foi realizada através do método de Kolmogorov e Smirnov. Uma vez que os dados tenham passado pelos dois testes, a comparação entre dados paramétricos foi feita através da análise de variância de duas vias (ANOVA), com o teste complementar de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou $p < 0,05$.

4.11 Grau de Severidade dos procedimentos

1 - Avaliação hemodinâmica e sacrifício dos animais: sem recuperação.

Durante a avaliação hemodinâmica os animais estarão anestesiados e, após o procedimento, serão sacrificados ainda sob o efeito dos medicamentos.

2 - Aplicação de monocrotalina e de anestésico: leve.

3 - Progressão da dor: moderado.

Embora a hipertensão arterial pulmonar seja uma doença progressiva associada com dor e desconforto, os animais serão sacrificados entre a terceira e a quarta semanas após a aplicação da droga, não sendo esse tempo suficiente para levar à morte dos animais.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da Hipertensão Pulmonar

5.1.1 Avaliação cardíaca

A avaliação cardíaca foi mensurada para verificar se o modelo da doença foi estabelecido, a partir de duas de suas características: pressão ventricular elevada e hipertrofia cardíaca direita.

5.1.1.1 Registro de pressão ventricular

A partir dos dados observados (figuras 1 e 2), observou-se um aumento significativo da pressão sistólica do ventrículo direito nos animais tratados com monocrotalina (MS e MT) em relação aos seus respectivos controles (175% e 131%, respectivamente). Padrão semelhante foi observado na PDFVD (aumento de 327% e 110% nos grupos MS e MT em relação aos grupos CS e CT), acrescido, entretanto, de uma diminuição da pressão diastólica final do ventrículo direito nos animais com monocrotalina que realizaram treinamento físico aeróbio em relação ao grupo MS.

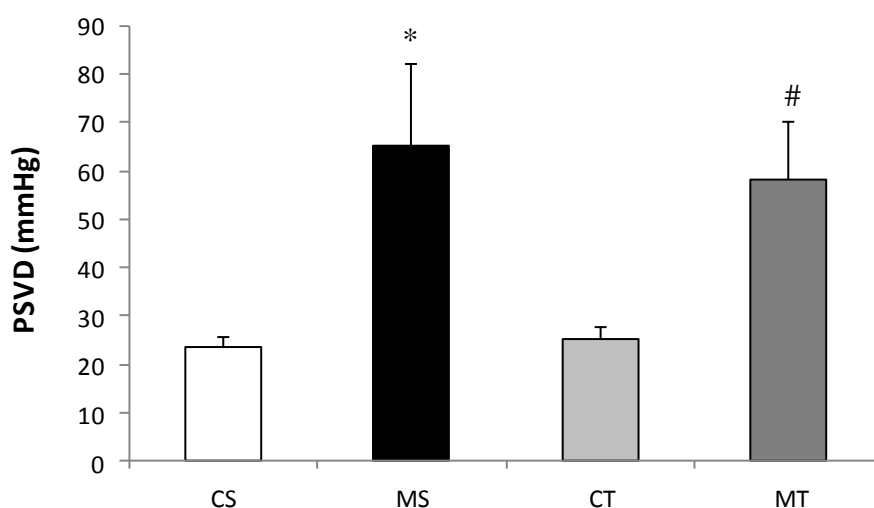


Figura 4. Pressão ventricular sistólica direita (PSVD), em mmHg. Resultados expressos como média \pm DP, com $n = 6$ animais por grupos. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT =

monocrotalina treinado. *significativo versus CS; # significativo versus CT. ANOVA de duas vias seguida por teste complementar de Tukey. $P < 0,001$.

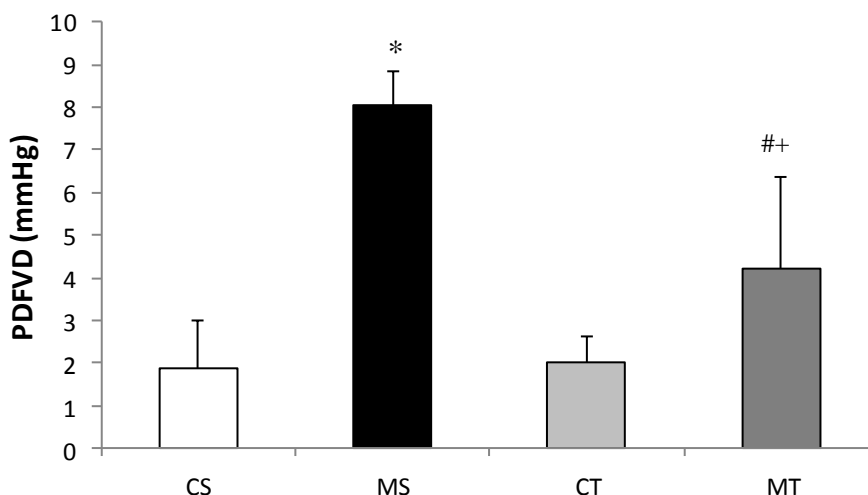


Figura 5. Pressão ventricular diastólica final direita (PDFVD), em mmHg. Resultados expressos como média \pm DP, com $n = 6$ animais por grupos. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * significativo versus CS; # significativo versus CT; + significativo versus MS. ANOVA de duas vias seguida por teste complementar de Tukey. $P < 0,005$.

5.1.1.2 Hipertrofia Cardíaca e do Ventrículo Direito

O índice de hipertrofia cardíaca relacionou o peso total do coração pelo peso do animal (em mg/g peso corporal); O segundo e o terceiro índices – agora de hipertrofia do ventrículo direito – foram realizados pela razão entre o peso do ventrículo direito (VD) pelo peso do animal e pela razão entre o peso do VD pelo peso do coração (em miligramas), respectivamente; o último índice - também apenas do VD – deu-se pela razão entre o ventrículo direito – em miligramas – e o comprimento da tíbia, em milímetros.

Os quatro índices apresentaram o mesmo padrão de resultado: um aumento significativo monocrotalina sedentário, quando comparados, respectivamente, aos grupos controle sedentário e controle treinado.

No primeiro índice – massa do coração pela massa corporal – esse aumento,

foi de, respectivamente, 16 e 27% nos grupos MS e MT. Quando relacionado apenas o ventrículo direito pela massa do animal – segundo índice – os aumentos encontrados foram de 72% e 82%, respectivamente. Quando o ventrículo direito foi relacionado com a massa do coração, os aumentos foram de 47% e 53%. Por fim, no último índice – peso do ventrículo direito pelo comprimento da tibia -, mostrando o mesmo padrão, os aumentos foram, respectivamente, de 70 e 73%.

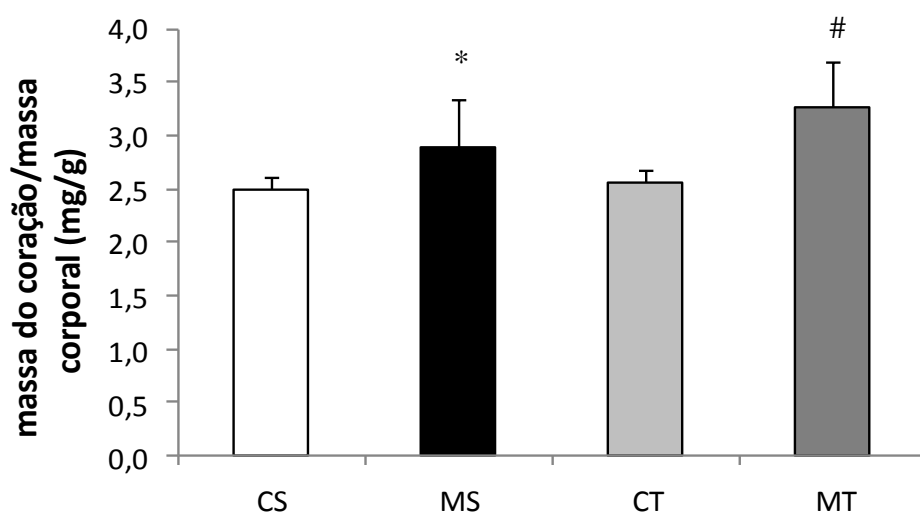


Figura 6. Índice de hipertrofia cardíaca (massa do coração/massa corporal), em mg/g. Resultados expressos como média \pm DP, com n= 8-9 animais por grupos. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * significativo versus CS; # significativo versus CT; ANOVA de duas vias seguida por teste complementar de Tukey. $P < 0,05$.

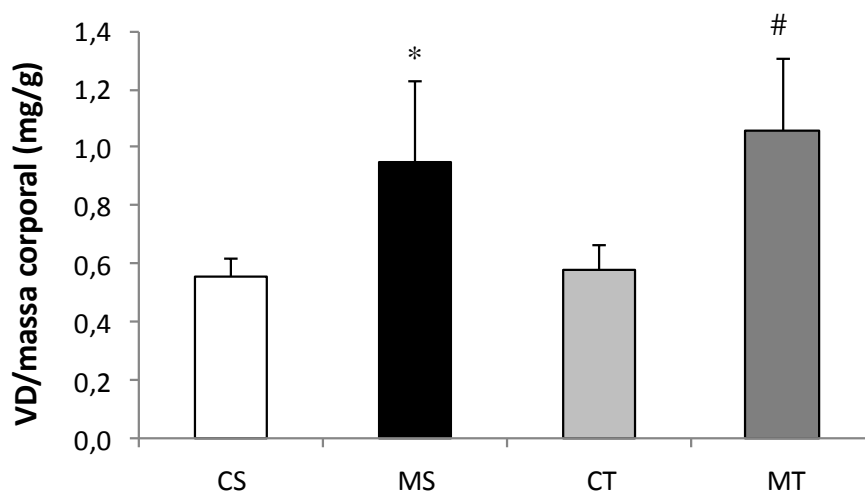


Figura 7. Índice de hipertrofia do ventrículo direito (massa do VD/massa

corporal), em mg/g. Resultados expressos como média \pm DP, com n= 8-9 animais por grupos. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * significativo versus CS; # significativo versus CT; ANOVA de duas vias seguida por teste complementar de Tukey. P<0,05.

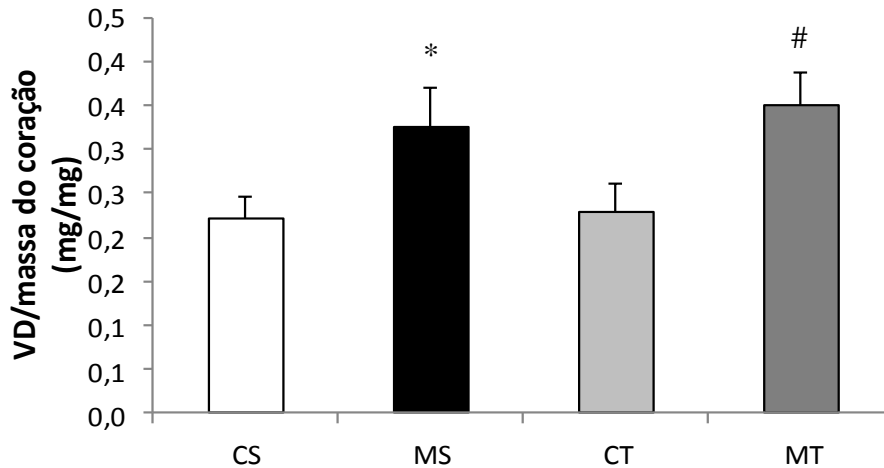


Figura 8. Índice de hipertrofia do ventrículo direito (massa do VD/massa do coração), em mg/mg. Resultados expressos como média \pm DP, com n= 8-9 animais por grupos. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * significativo versus CS; # significativo versus CT; ANOVA de duas vias seguida por teste complementar de Tukey. P<0,05.

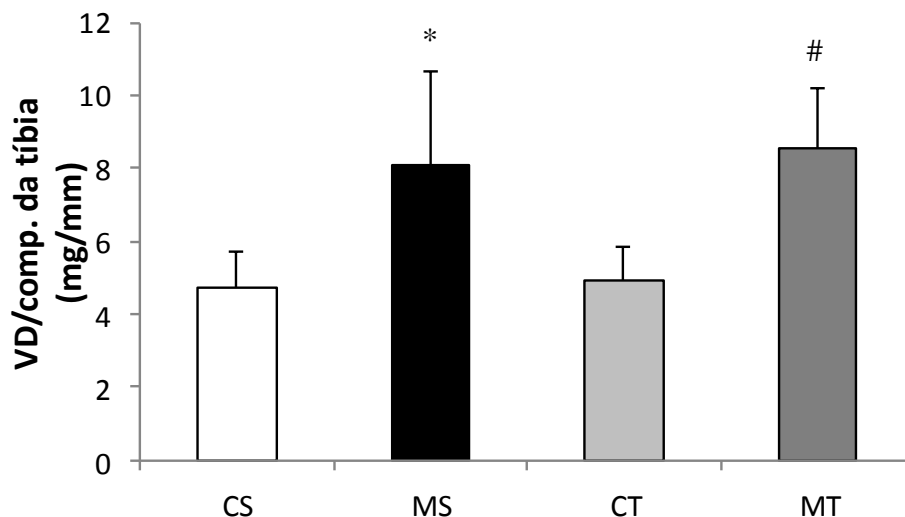


Figura 9. Índice de hipertrofia do ventrículo direito (massa do VD/comprimento da tibia), em mg/mm. Resultados expressos como média \pm DP, com n= 8-9 animais por grupos. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * significativo versus CS; # significativo versus CT; ANOVA de duas vias seguida por teste complementar de Tukey. P<0,05.

versus CT; ANOVA de duas vias seguida por teste complementar de Tukey. $P < 0,05$.

5.1.2 Massa Corporal

A massa corporal dos animais foi mensurada todas as semanas e está expressa em gramas. A “semana 0” refere-se à massa corporal logo antes da injeção de monocrotalina. A partir da terceira semana já foram identificadas diferenças significativas. Neste período, o grupo MS apresentou uma massa corporal significativamente menor que o grupo CS (uma diferença de 21%) e na quarta semana essa diferença se acentuou (31%) (tabela 3 e Figura 1). O desvio padrão dos resultados não foi inserido na figura 1, pois se tornava difícil a sua compreensão. Entretanto, ele é exibido na tabela que vem anteriormente apresentada à figura.

A Figura 2 demonstra a porcentagem de massa ganha em relação à massa dos animais antes da injeção. A partir desses dados, encontramos uma forte diferença de massa corporal na quarta semana entre os animais do grupo controle sedentário e monocrotalina sedentário. Enquanto o primeiro grupo aumentou sua massa em 42% nas quatro semanas, o grupo monocrotalina apresentou um aumento de apenas 19%. Mais do que isso, a diferença entre esses dois grupos, que era de apenas 9% na terceira semana, passou para 24% na quarta semana.

Tabela 3. Massa corporal dos animais (g)					
	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
CS	231±30	258±32	292±35	312±38	329±42
MS	220±21	259±21	272±23	278±21*	261±25*
CT	218±16	244±19	272±20	293±16	314±17
MT	210±24	234±32	255±38	259±35	277±35

Massa corporal dos animais, em gramas. Resultados expressos como média ± DP, com n= 7 animais por grupos. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * significativo versus CS; $P < 0,05$.

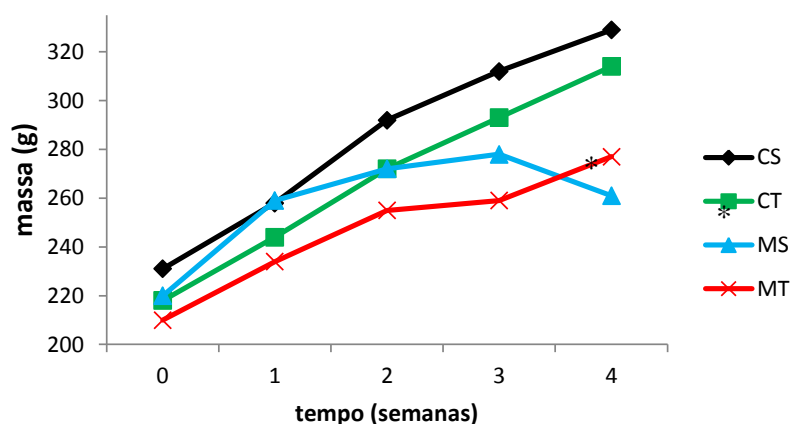


Figura 10. Massa corporal dos animais, em gramas, ao longo do tempo. Na abcissa está representado o tempo, em semanas e, na ordenada, as massas, em gramas. Resultados expressos como média, com n= 7 animais por grupos. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado.* significativo versus CS; P<0,05.

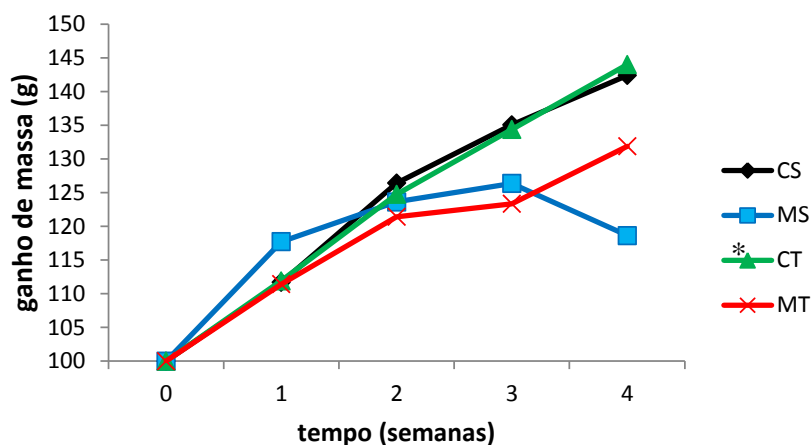


Figura 11. Ganho de massa corporal dos animais, em porcentagem, ao longo do tempo. Na abcissa está representado o tempo, em semanas e, na ordenada, diferentes porcentagens, partindo de 100%. Resultados expressos como média, com n= 7 animais por grupos. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * significativo versus CS; P<0,05.

5.2 Análise de Estresse Oxidativo

Para análise do dano oxidativo e presença de espécies reativas de oxigênio, foram realizadas análises de lipoperoxidação por quimiluminescência e concentração do peróxido de hidrogênio. Adicionado a isso, para verificar a ação do sistema antioxidante enzimático, foram analisadas as atividades das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR), a expressão gênica de catalase e superóxido dismutase bem como a relação da glutathione reduzida pela oxidada.

5.2.1 Concentração de Peróxido de Hidrogênio

Em relação às concentrações de peróxido de hidrogênio, os ratos com hipertensão arterial pulmonar demonstraram níveis superiores dessa espécie ativa de oxigênio (330% e 334%, respectivamente) quando comparados aos seus respectivos controles. O treinamento físico, além disso, aumentou, nos animais hipertensos, esta espécie em 12% quando comparado aos que não realizaram exercício aeróbio.

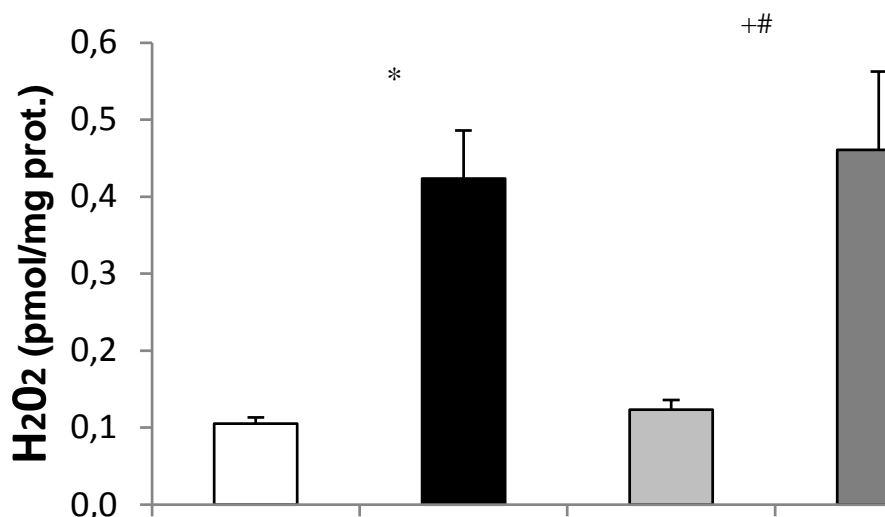


Figura 12. Concentração de H₂O₂ (pmol/mg prot.) em homogeneizado de gastrocnêmio. Resultados expressos como média \pm DP, com n= 8-9 animais por grupo. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * significativo versus CS; # significativo versus CT; + significativo versus MS. ANOVA de duas vias seguida por teste

complementar de Tukey. $P < 0,05$.

5.2.2 Atividade da Superóxido Dismutase

A atividade da SOD apresentou-se elevada apenas nos grupos que realizaram treinamento físico. Assim, houve um aumento de 28% na atividade dessa enzima no grupo CT e um aumento de 42% no grupo MT em relação aos grupos CS e MS, respectivamente.

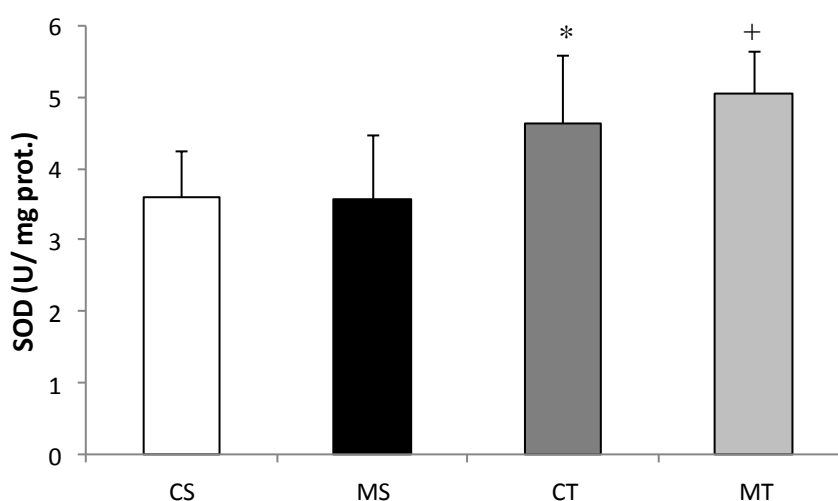


Figura 13. Atividade da superóxido dismutase (U/mg prot.) em homogeneizado de gastrocnêmio. Resultados expressos como média \pm DP, com $n = 7-9$ animais por grupo. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * significativo versus CS; + significativo versus MS. ANOVA de duas vias seguida por teste complementar de Tukey. $P < 0,05$.

5.2.3 Expressão da Superóxido Dismutase

Em relação ao imunoconteúdo de SOD, percebemos que os animais do grupo MS apresentaram um aumento dessa variável em relação ao grupo CS de 68%. Além disso, os animais controles treinados apresentaram um aumento ainda maior em relação a esse grupo (159%). Além disso, os animais do grupo MT apresentaram valores maiores de SOD quando comparados aos animais do grupo MS (54%).

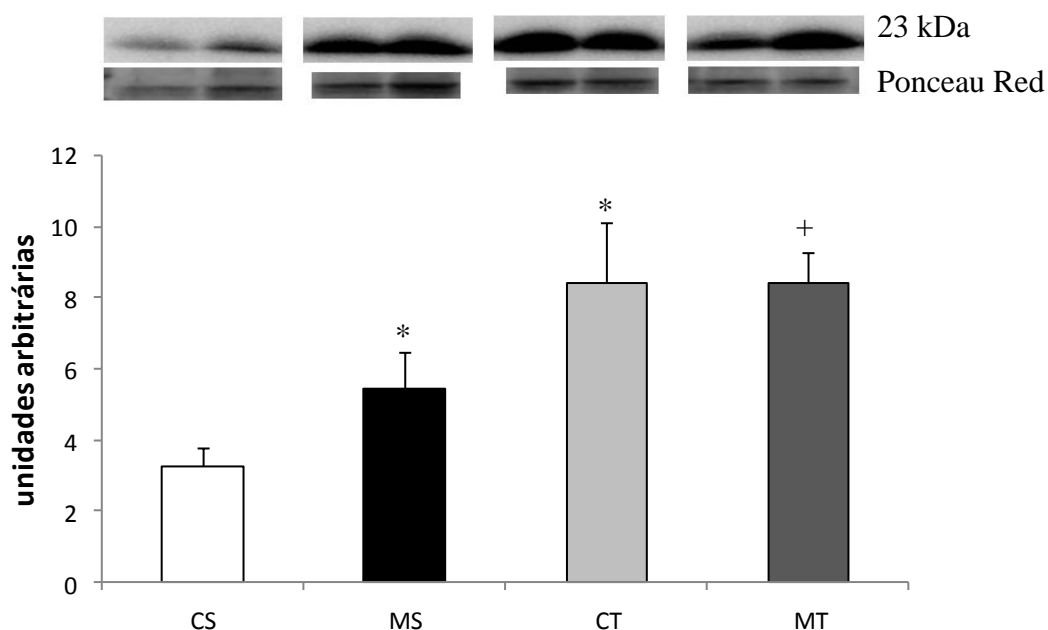


Figura 14. Expressão proteica da superóxido dismutase, em unidades arbitrárias, em homogeneizado de gastrocnêmio. Resultados expressos como média \pm DP, com $n= 5-6$ animais por grupo. Imagens representativas, contendo duas amostras por grupo. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * significativo versus CS; + significativo versus MS. ANOVA de duas vias seguida por teste complementar de Tukey. $P<0,05$.

5.2.4 Atividade da Catalase

Da mesma forma que na superóxido dismutase, houve um aumento da atividade da catalase apenas nos animais que realizaram exercício físico. Esse aumento foi de 21% nos animais controles treinados em relação aos controles sedentários e de 27% nos animais monocrotalina treinados em relação aos monocrotalina treinados.

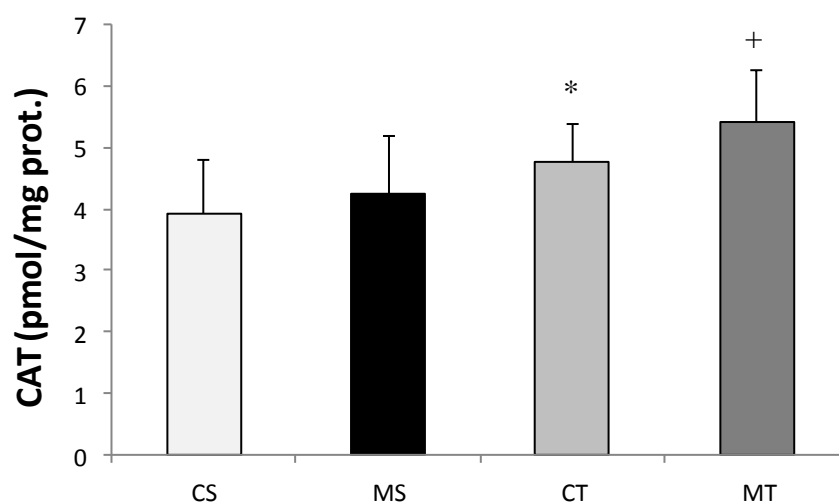


Figura 15. Atividade da catalase (pmol/mg prot.) em homogeneizado de gastrocnêmio. Resultados expressos como média \pm DP, com $n=8$ animais por grupo. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * significativo versus CS; + significativo versus MS. ANOVA de duas vias seguida por teste complementar de Tukey. $P<0,05$.

5.2.5 Expressão da Catalase

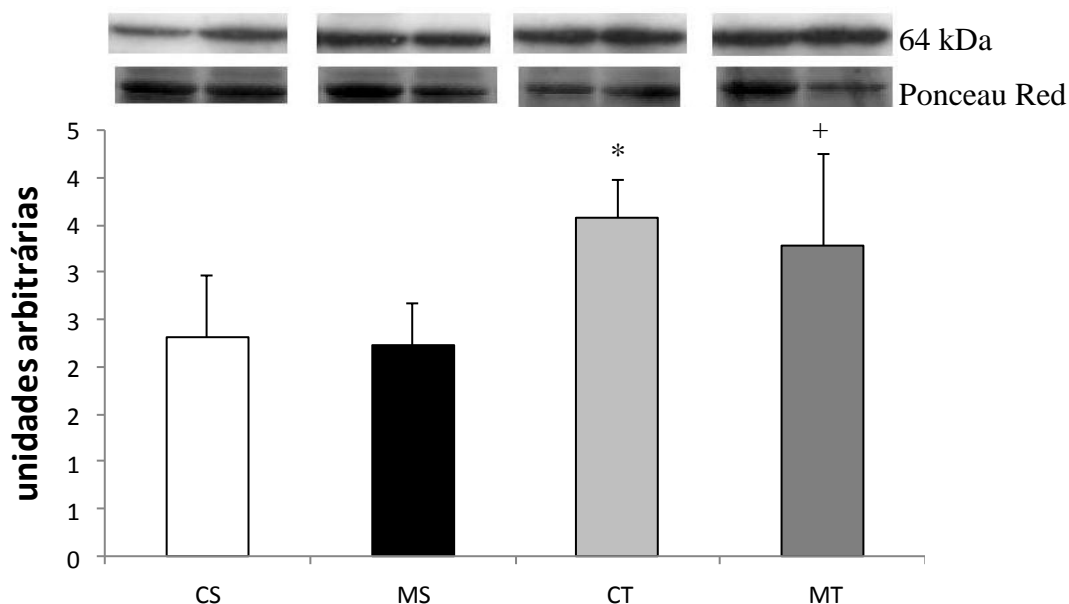


Figura 16. Expressão proteica da catalase, em unidades arbitrárias, em homogeneizado de gastrocnêmio. Resultados expressos em média \pm DP, com 6 animais por grupo. Imagens representativas, contendo duas amostras por grupo. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * significativo versus CS; + significativo versus MS. ANOVA

de duas vias seguida por teste complementar de Tukey. $P < 0,05$.

5.2.6 Atividade da Glutathiona Peroxidase

Houve uma diminuição (39%) significativa da atividade da GPx nos animais sedentários com monocrotalina em relação ao grupo controle sedentário. Quando os animais com hipertensão pulmonar foram treinados, esses valores voltaram aos níveis de controle, aumentando significativamente (108%) em relação ao grupo monocrotalina sedentário.

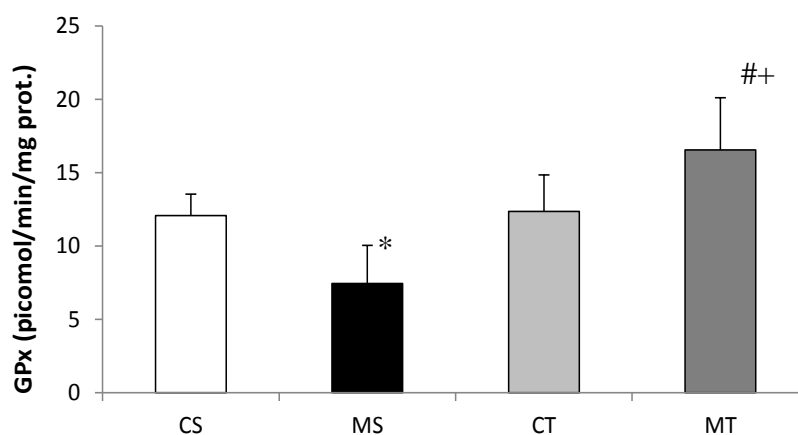


Figura 17. Atividade da glutathiona peroxidase (GPx.), em picomol/min/mgprot., em homogeneizado de gastrocnêmio. Resultados expressos como média \pm DP, com $n = 7$ animais por grupo. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * significativo versus CS; + significativo versus MS; # significativo versus CT. ANOVA de duas vias seguida por teste complementar de Tukey. $P < 0,05$.

5.2.7 Atividade da Glutathiona Redutase

Em relação à glutathiona redutase, houve uma diminuição significativa na sua atividade para os animais que receberam injeção de monocrotalina. Os animais do grupo MS diminuíram em 28% essa atividade em relação ao grupo controle sedentário enquanto os animais do grupo MT diminuíram essa atividade em 12% quando comparados aos animais do grupo controle treinado.

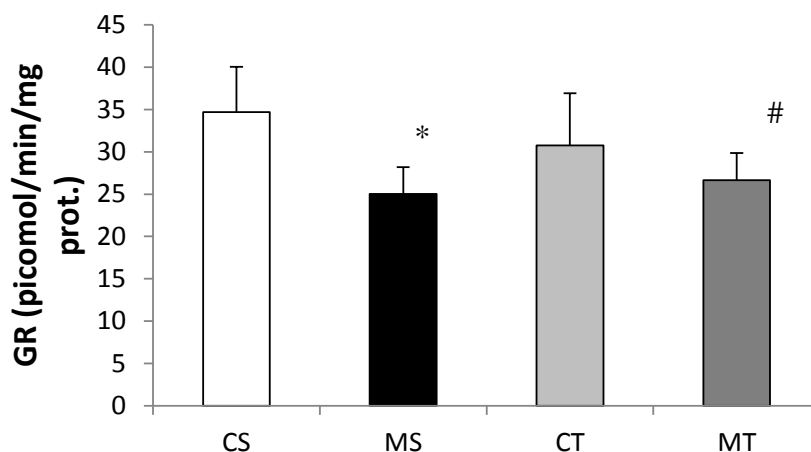


Figura 18. Atividade da glutathione redutase (GR), em picomol/min/mgprot, em homogeneizado de gastrocnêmio. Resultados expressos como média \pm DP, com n= 7 animais por grupo. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * significativo versus CS; # significativo versus CT. ANOVA de duas vias seguida por teste complementar de Tukey. P<0,05

5.2.8 Relação GSH/GSSG

Na relação da glutathione reduzida (GSH) pela glutathione oxidada (GSSG), a única diferença significativa encontrada foi um aumento nessa relação nos animais do grupo controle treinado em relação aos animais do grupo controle sedentário. Esse aumento foi de 33%.

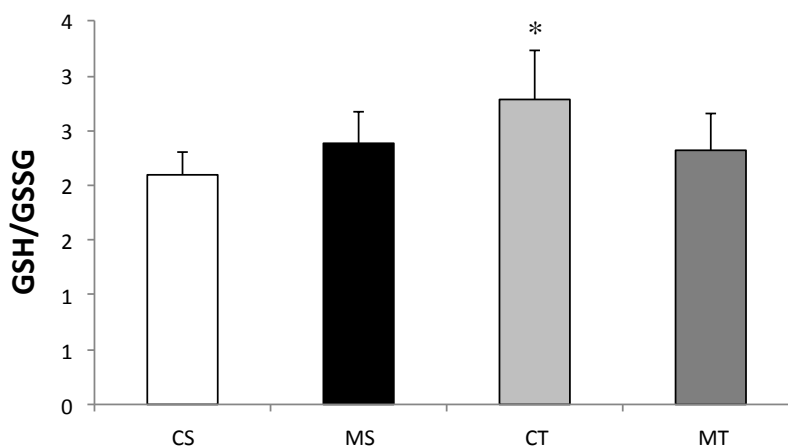


Figura 19. Relação da glutathione total pela oxidada, em homogeneizado de

gastrocnêmio. Resultados expressos como média \pm DP, com $n = 6-8$ animais por grupo. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * significativo versus CS; + significativo versus MS. ANOVA de duas vias seguida por teste complementar de Tukey. $P < 0,05$.

5.2.9 Expressão da Glutathiona S-transferase

Em relação à GST, foi observado um aumento significativo da sua expressão proteica apenas no grupo MS em relação ao CS. Esse aumento foi de 59%.

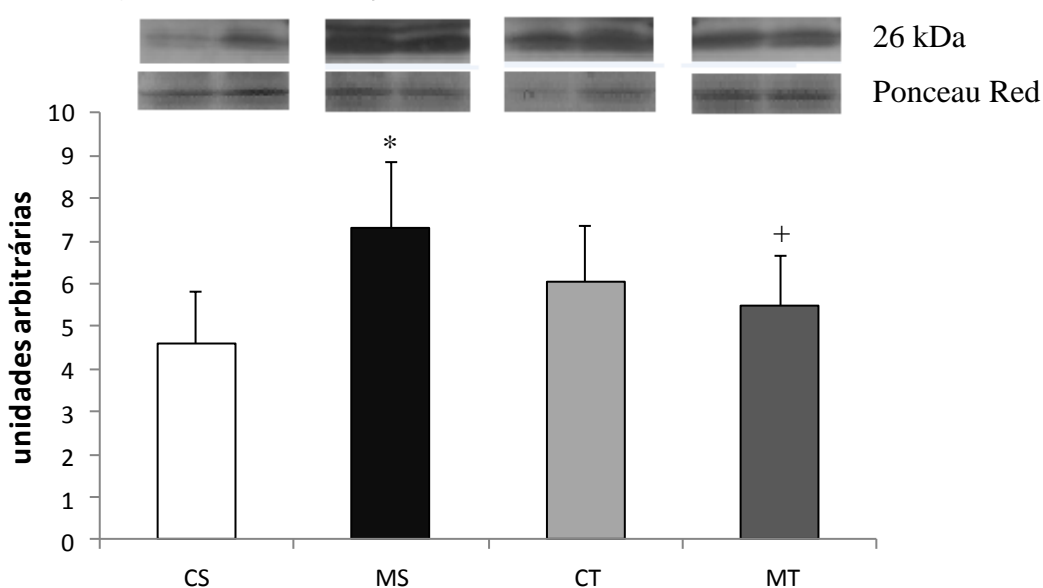


Figura 20. Expressão proteica da glutathiona S-transferase, em unidades arbitrárias, em homogeneizado de gastrocnêmio. Resultados expressos como média \pm DP, com $n = 5-6$ animais por grupo. Imagens representativas, contendo duas amostras por grupo. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * significativo versus CS; + significativo versus MS. ANOVA de duas vias seguida por teste complementar de Tukey. $P < 0,05$

5.2.10 Lipoperoxidação por Quimiluminescência

Ao avaliar a lipoperoxidação, percebeu-se um aumento do dano lipídico de 56% nos animais do grupo monocrotalina sedentário em relação ao seu controle (CS). Além disso, embora o grupo MT também tenha aumentado em relação ao seu

grupo controle, ocorreu uma diminuição significativa (29%) no dano lipídico deste grupo quando comparado ao grupo monocrotalina sedentário, atingindo valores semelhantes aos do controle sedentário.

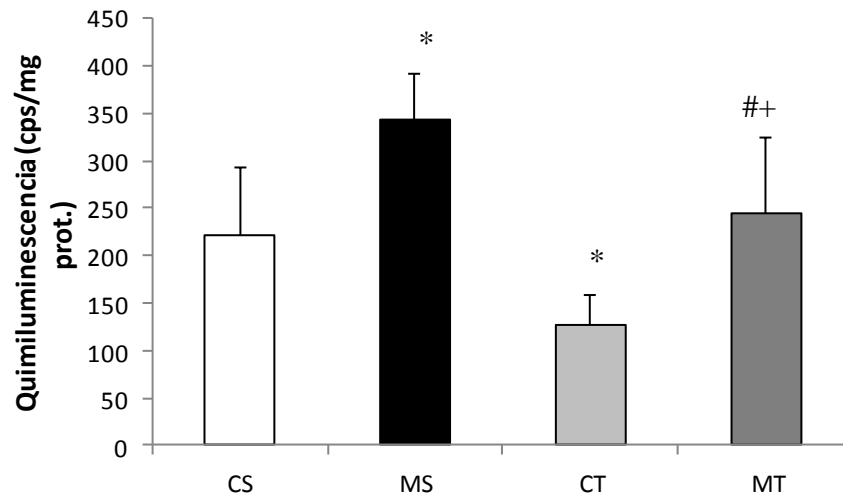


Figura 21. Quimiluminescência (cps/mg prot.) em homogeneizado de gastrocnêmio. Resultados expressos como média \pm DP, com $n = 7-9$ animais por grupo. CS = controle sedentário; MS = monocrotalina sedentário; CT = controle treinado; MT = monocrotalina treinado. * significativo versus CS; # significativo versus CT; + significativo versus MT. ANOVA de duas vias seguida por teste complementar de Tukey. $P < 0,05$

6 DISCUSSÃO

A partir do nosso conhecimento sobre a literatura atual, este é o primeiro estudo que analisa as potenciais alterações do estado redox celular, na musculatura esquelética, provocadas pelo exercício físico em animais com hipertensão arterial pulmonar. Foi observado um aumento na produção de espécies ativas de oxigênio na musculatura esquelética dos ratos que foram induzidos a desenvolver hipertensão pulmonar, sendo esse aumento não acompanhado de uma maior ativação do sistema antioxidante nos animais que permaneceram sedentários. Ao contrário, os animais que se exercitaram apresentaram um significativo aumento da expressão e da atividade de enzimas antioxidantes, seguido de uma redução no dano lipídico observado nessas células, o que pode sugerir uma adaptação benéfica para essa população.

A hipertensão arterial pulmonar é caracterizada por vasoconstrição e remodelamento da parede vascular pulmonar, ambos promotores de aumento da resistência da artéria pulmonar e de seus ramos (BOGAARD et al., 2009). No presente estudo, os animais que receberam monocrotalina apresentaram um aumento da pressão sistólica do ventrículo direito bem como um aumento da pressão diastólica final da mesma câmara. Esse resultado está altamente relacionado com o remodelamento da vasculatura pulmonar, pois, na medida em que a estrutura dos vasos se modifica, com a presença de espessamento da túnica média e proliferação da camada íntima, a resistência da artéria pulmonar se eleva. O aumento dessa resistência gera uma sobrecarga sobre o lado direito do coração (YAMAZATO et al., 2009) e este, por sua vez, acaba por apresentar tanto a sua pressão sistólica como a diastólica elevadas como resposta ao desafio de combater a maior sobrecarga imposta sobre ele.

Outros estudos com essa droga já encontraram, anteriormente, resultados semelhantes aos encontrados nesse trabalho (MOHAMMADI et al., 2012), inclusive dentro de nosso laboratório (LEICHSENRING-SILVA et al., 2011, COLOMBO et al., 2013; LUDKE et al., 2010). Além disso, o exercício físico, nesses parâmetros, embora não tenha alterado as pressões no grupo controle, foi capaz de diminuir significativamente a pressão diastólica final direita dos animais hipertensos em relação aos que permaneceram sedentários. Esse é um efeito benéfico do exercício,

pois, na medida em que a pressão sistólica se mantém elevada para combater o aumento da resistência pulmonar, a pressão diastólica final dessa câmara aparece diminuída, sugerindo que uma possível diminuição da pós-carga tenha ocorrido. Resultado semelhante já foi encontrado anteriormente em nosso laboratório, quando SOUZA-RABBO (2008), realizou um protocolo de treinamento físico em animais com hipertensão arterial pulmonar durante cinco semanas e obteve pressão sistólica elevada e diastólica reduzida nos animais hipertensos que treinaram.

Juntamente com esses dados, os animais que receberam injeção de monocrotalina apresentaram uma significativa hipertrofia ventricular direita em relação aos seus respectivos grupos. O indicador de prognóstico mais importante de HP é o grau de disfunção ventricular presente e sua mudança morfológica. Padmavati e Pathak (1959) demonstraram em um estudo de caso com 127 pacientes de uma zona rural da Índia, portadores de Cor pulmonale, um aumento, em média, de 67% do tamanho do ventrículo direito. Essa resposta é determinante para a progressão da doença, pois a hipertrofia do ventrículo direito pode, com frequência, levar à dilatação do lado direito do coração, insuficiência da valva tricúspide, desvio do septo interventricular e, em última instância, contratilidade reduzida e insuficiência ventricular direita, o que leva o paciente a óbito (FRAZIER e BURKE, 2012).

Embora seja há muito tempo reconhecido pela literatura que o exercício físico pode provocar hipertrofia cardíaca fisiológica, em especial no ventrículo esquerdo (MARON, 1986; DOUGLAS et al., 1997; GHORAYEB et al., 2005; ATCHLEY E DOUGLAS, 2007), não foram observadas mudanças morfológicas no tecido cardíaco dos animais que treinaram. Isso talvez se deva ao período relativamente curto de treinamento – quatro semanas -, insuficiente para provocar essas alterações. Em um estudo de Handoko e colaboradores (2008) foi realizado um protocolo de treinamento físico aeróbio em ratos com hipertensão arterial pulmonar, com diferentes doses de monocrotalina, e o mesmo padrão foi observado: hipertrofia do ventrículo direito nos animais com hipertensão pulmonar, sem que o exercício pudesse alterar esse parâmetro durante um período, também, de quatro semanas.

Um dos fatores limitantes nessa doença é a ausência, na literatura, de protocolos específicos de treinamento físico aeróbio bem estabelecidos tanto para humanos como para modelos experimentais até o momento. No nosso laboratório,

pela inexistência de um equipamento que avalie consumo de oxigênio de forma direta, estabelecemos a intensidade do programa de treinamento através de um estudo de RODRIGUES e colaboradores (2007), que relacionaram o consumo direto de oxigênio com um teste de velocidade máxima em ratos diabéticos com insuficiência cardíaca. Como realizamos um teste no início do treinamento e outro na metade, conseguimos manter um controle da intensidade do exercício, garantindo a eficiência do protocolo. Apesar disso, futuras investigações nesse contexto seriam muito relevantes para que se possa estudar melhor esse modelo através de protocolos específicos para essa população.

Outro dado importante encontrado nesse trabalho é a menor massa corporal que os animais doentes possuem em relação aos animais saudáveis. Ao final de quatro semanas, o grupo MS apresentava uma massa significativamente menor que o grupo CS e a taxa de ganho de massa também se mostrou menor. Diversos trabalhos do nosso laboratório (SOUZA-RABBO et al., 2008; COLOMBO et al., 2013) e do restante da literatura (ZAMBELLI et al., 2011; PAFFET et. al., 2012), mostram que o ganho de massa dos animais que recebem monocrotalina é menor que os animais saudáveis. Entretanto, os mecanismos que levam a essa perda são pouco conhecidos, apesar de estarem relacionados com as insuficiências cardíaca e pulmonar desenvolvidas, que diminuem a perfusão/ventilação dos tecidos, com consequente perda de massa muscular. É importante ressaltar que o grupo MT, mesmo demonstrando uma tendência de menor massa em relação ao grupo CT, não demonstrou diferenças significativas. O grande desvio padrão percebido nesse grupo pode sugerir que alguns animais estão conseguindo manter seu peso em função do exercício físico. Isso pode ser comprovado pela taxa de ganho de peso que se mostrou sempre em crescimento ao longo das quatro semanas, enquanto a do grupo MS decaiu da terceira para a quarta semana.

Uma das explicações para esse fato seria que o exercício físico, ao longo do tempo, estaria não gerando um quadro de hipertrofia nesses animais, mas, sim, impedindo uma perda de massa muscular - presente na hipertensão pulmonar, em função da baixa capacidade funcional que essa população possui. Um estudo de De Man e colaboradores (2009) realizou um treinamento físico de baixa intensidade em pacientes com hipertensão arterial pulmonar. Apesar de eles não terem encontrado aumento da área de secção transversa do músculo quadríceps após o treinamento,

observaram aumento da capilarização, com mais capilares por fibra muscular e maior atividade enzimática oxidativa. Esses resultados sugerem que o exercício promova um aumento da perfusão, a longo prazo, o que poderia contribuir para uma menor perda de peso quando comparado aos animais sedentários submetidos à injeção de monocrotalina.

Tendo em vista os resultados apresentados até o momento – pressão ventricular elevada, hipertrofia cardíaca direita e perda de massa corporal –, esses achados corroboram que o modelo de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina foi eficaz no presente estudo.

Neste trabalho, o treinamento físico promoveu melhora nos parâmetros cardiovasculares apenas na pressão diastólica final direita dos animais com monocrotalina e não alterou tais parâmetros nos animais saudáveis. Na musculatura esquelética, também devido ao reduzido tempo de treinamento, acreditamos que as mudanças provocadas pelo exercício físico estariam presentes mais ao nível molecular do que macroscópico, já que essas últimas levam um tempo maior para serem distinguidas. Seguindo por esse raciocínio, as análises moleculares de estresse oxidativo, o principal objetivo desse estudo, demonstraram, de fato, que a doença, *per se*, altera a cascata de reações envolvidas na produção de espécies ativas de oxigênio na musculatura esquelética desses animais e que o exercício também possui influência nesse sistema.

As concentrações de peróxido de hidrogênio, uma espécie ativa de oxigênio, apresentaram-se elevadas na musculatura esquelética dos animais que receberam monocrotalina, tanto sedentários como treinados, em relação aos seus grupos controles. Além disso, nos animais com monocrotalina que realizaram exercício físico (grupo MT), o aumento da concentração dessa espécie foi maior. Analisando a enzima superóxido dismutase, que catalisa a formação do peróxido de hidrogênio a partir de ânion superóxido, observamos um aumento da sua atividade apenas nos grupos que realizaram exercício físico (controle treinado e monocrotalina treinado), o que parece ser um efeito exclusivo dessa intervenção. A literatura mostra que, enquanto alguns estudos não percebem uma atividade da SOD elevada no músculo esquelético (ALESSIO e GOLFARB, 1988; LAUGHLIN et al., 1990), a maioria dos trabalhos indica um aumento significativo da atividade dessa enzima induzida pelo treinamento físico (JENKINS, 1983 ; POWERS et al., 1994; OH-ISHI et al., 1997).

Quando analisada a expressão dessa mesma enzima, foi observado seu aumento nos grupos monocrotalina sedentário e monocrotalina treinado em relação aos seus respectivos controles. Portanto, a expressão aumentada de SOD nos grupos monocrotalina parece ser uma característica da doença e pode explicar a maior formação de peróxido de hidrogênio nos animais doentes. Associada a isso, a maior atividade da enzima no grupo monocrotalina treinado pode explicar a produção de peróxido de hidrogênio ainda maior nesse grupo em relação ao grupo monocrotalina sedentário.

De acordo com Franco e colaboradores (1999), a resposta das enzimas antioxidantes, no músculo esquelético, expostas ao estresse oxidativo podem ser menos pronunciadas do que o aumento em seus níveis de RNAm. No caso do presente trabalho, a hipertensão arterial pulmonar pode estar provocando um aumento de estresse oxidativo, sendo, portanto, a responsável pela inibição da atividade da SOD, sendo esse um padrão observado em outros estudos (TRAVACIO et al., 2001). O exercício físico, ao contrário, por promover adaptações do sistema antioxidante, pode estar suprimindo essa inibição causada pela doença. Para melhor entendimento dessas respostas, estudos deveriam ser realizados futuramente a fim de entender os mecanismos pelos quais o exercício elimina a inibição da função pós-transcricional dos genes que codificam a enzima superóxido dismutase provocadas pela HAP.

Os resultados da SOD sugerem, portanto, que a musculatura esquelética, em especial o músculo gastrocnêmio, apresenta maior concentração de ânion superóxido na presença da doença. Sendo a SOD a primeira defesa contra ânions superóxido (LINKE et al., 2005), o aumento da função dessa enzima pode significar que há um maior combate contra uma possível formação elevada dessa espécie ativa de oxigênio.

Em relação ao grupo controle treinado, tanto a expressão quanto a atividade da SOD mostraram-se elevadas, um efeito esperado do exercício físico (OH-ISHI et al., 1997). Entretanto, a concentração de peróxido de hidrogênio manteve-se igual à do grupo controle sedentário. Isso sugere que mecanismos do sistema antioxidante podem estar eliminando o H_2O_2 produzido e serão, portanto, discutidos a seguir.

Uma das vias de eliminação do peróxido de hidrogênio é a sua conversão à água e oxigênio pela enzima catalase. No presente estudo, a atividade dessa

enzima, no músculo esquelético, mostrou-se elevada apenas nos animais que treinaram, sugerindo que a droga não interferiu na sua atividade. As evidências das alterações da catalase com o exercício físico na musculatura esquelética são pouco conclusivas, com estudos mostrando tanto diminuição (LEEUEWENBURGH et al., 1994) como aumento na sua atividade (HIGUCHI et al., 1985; SEMIN et al., 2000; TERBLANCHE, 2000).

No presente estudo, o seu aumento pode indicar que a catalase está sendo um dos fatores responsáveis pela eliminação de peróxido de hidrogênio produzido em decorrência do exercício no gastrocnêmio desses animais. Essa pode ser uma explicação para que a concentração dessa molécula nos animais controles treinados não se encontre maior que a dos controles sedentário.

Por outro lado, a concentração de peróxido, como já vimos, é elevada nos animais doentes tanto sedentários como treinados. Entretanto, quando vamos analisar a expressão da catalase, percebemos um aumento da mesma no grupo monocrotalina treinado em relação ao grupo monocrotalina sedentário. Essa adaptação, provocada pelo exercício físico, provavelmente está sendo benéfica para o animal, pois é uma fonte antioxidante que acaba combatendo as espécies ativas de oxigênio provenientes não só do exercício, mas da própria doença.

Para avaliarmos outras fontes de eliminação do peróxido de hidrogênio, quantificamos, também, a atividade da enzima glutathione peroxidase. Surpreendentemente, encontramos não apenas um aumento da atividade dessa enzima no grupo hipertenso que treinou, mas também uma diminuição da sua atividade no grupo hipertenso que permaneceu sedentário em relação ao controle sedentário. Assim, enquanto nos animais que treinaram foi encontrada outra fonte de eliminação do peróxido hidrogênio, nos animais doentes sedentários o oposto ocorreu: uma perda de função de uma via importante para eliminação das espécies reativas de oxigênio. Sabe-se que na musculatura esquelética a GPx é de extrema importância e, muitas vezes, possui mais afinidade pela redução de peróxido de hidrogênio à água do que a catalase (TIIDUS et al., 1996). Assim, esse resultado parece ser chave no modelo de monocrotalina. Nos animais monocrotalina sedentários, a diminuição da atividade dessa enzima, não acompanhada por um aumento da catalase, pode sugerir que o peróxido de hidrogênio produzido não está sendo eliminado de forma adequada, favorecendo a produção de radicais hidroxila.

Por outro lado, nos animais monocrotalina treinados, o aumento da atividade da GPx, acompanhado de um aumento da catalase, conseguem manter a função celular, eliminando uma maior produção de peróxido de hidrogênio, apesar de essa ainda se manter elevada.

Embora a expressão da GPx não tenha sido mensurada, se levarmos em conta, novamente, as considerações de Franco e colaboradores (1999), em que as respostas das atividades das enzimas antioxidantes, expostas ao estresse oxidativo são menos pronunciadas do que o aumento em seus níveis de expressão gênica, podemos supor que, mesmo que a expressão proteica esteja alterada, o aumento de estresse oxidativo pela doença parece exercer um efeito inibitório sobre sua atividade, enquanto o exercício restaura a sua função. Em relação aos animais controles treinados, embora não tenhamos encontrado um aumento da atividade da GPx, uma adaptação que seria esperada pelo exercício físico na musculatura esquelética, percebemos um aumento da relação da glutathiona reduzida pela glutathiona oxidada (GSH/GSSG) nesses animais quando comparados aos animais controles sedentários. A glutathiona é o antioxidante não-enzimático mais abundante no meio intracelular (MEISTER e ANDERSON, 1983). Ela, na sua forma reduzida, é o substrato fundamental para reduzir o peróxido de hidrogênio à água e oxigênio pela glutathiona peroxidase.

A síntese de GSH ocorre principalmente no fígado. A partir daí, ela é liberada dentro da circulação e transportada para os tecidos periféricos (POWERS e LENNON, 1999). Existem bastantes evidências de que o exercício físico regular promove um aumento nos níveis de GSH no músculo esquelético (SEN et al., 1992; LEEUWENBURGH et al., 1997). Entretanto, o mecanismo exato para essa elevação é desconhecido. Teoricamente, o aumento de GSH em músculos treinados poderia ser explicado pelo aumento na síntese ou na habilidade de captar maiores quantidades de GSH do sangue para a célula (POWERS e LENNON, 1999).

Tendo em vista que a relação das glutathionas mostrou-se elevada e a GPx não se mostrou diferente dos animais que não treinaram, é provável que o peróxido produzido em função do exercício tenha sido eliminado através da catalase, pois, essa sim, mostrou tanto sua atividade como sua expressão proteica elevadas. Assim, a produção de peróxido de hidrogênio foi removida pela catalase, poupando GSH.

Vale ressaltar que, embora existam trabalhos na literatura (OH-ISHI et al., 1997) demonstrando que a GPx tem maior afinidade pelo peróxido de hidrogênio do que a catalase no músculo esquelético, talvez não só a baixa concentração dessa espécie ativa, mas também o período de treinamento, relativamente curto, não tenham sido suficientes, como o foi em relação à catalase, para induzir alterações na atividade dessa enzima nos animais saudáveis. Apesar disso, como já foi dito, o exercício teve papel fundamental sobre a GPx na doença, pois elevou a atividade da enzima nos animais monocrotalina treinado, enquanto os animais sedentários apresentaram índices menores que os do grupo controle que também não treinaram.

Outro dado importante desse trabalho é o nível de expressão proteica elevado da GST nos animais monocrotalina sedentários. As GSTs são enzimas que agem na detoxificação de compostos alquilantes, tanto endógenos como exógenos, incluindo os fármacos, como a monocrotalina. Essas enzimas catalisam a redução destes compostos através do grupamento -SH da glutathione, neutralizando seus sítios eletrofílicos e transformando-os em produtos mais hidrossolúveis, que são mais facilmente metabolizados (HABIG et al., 1974). A monocrotalina é uma droga que, no seu processo de metabolização à dehidromonocrotalina, reage com GSH, formando ácido monocrotálico (Lamé et al, 1991). Nesse processo, há a necessidade de GST, o que explica o resultado encontrado. É interessante notar que apesar da GST consumir glutathione, a relação dessa proteína reduzida pela oxidada não se mostrou alterada. Uma das explicações poderia ser a baixa atividade da GPx também presente no grupo MS. Assim, enquanto nesse grupo, a relação é mantida pela baixa atividade dessa enzima, no grupo MT sugere-se que a relação é mantida pela maior síntese de glutathione reduzida ou pela captação dessa proteína pela célula muscular em resposta ao treinamento físico. Ainda, interessante, os animais monocrotalina treinados não demonstraram a expressão da GST elevada. É possível que outros mecanismos sob efeito do exercício sejam ativados, sendo, portanto, vias alternativas de detoxificação da monocrotalina.

Para obtermos uma análise completa da via de oxidação e redução da glutathione, importante para a remoção de H_2O_2 , analisamos a atividade da glutathione redutase, a enzima responsável por reduzir, novamente, a glutathione anteriormente oxidada pela GPx. Em relação aos animais controle treinados, não encontramos diferença na atividade da GR em relação aos animais do grupo controle sedentário.

Embora, teoricamente, fosse esperado um aumento dessa enzima, é presente na literatura que, enquanto o exercício físico promove aumento no conteúdo de GSH na musculatura esquelética, os resultados de GR são menos conclusivos, pois há estudos que mostram um aumento (VENDITTI e DI MEO, 1997) e outros uma diminuição ou não alteração (SEN et al., 1992; LEEUWENBURGH et al., 1994) na sua atividade. Indo ao encontro de nossos resultados, Ortenblad e colaboradores (1997), não observaram diferença na atividade tanto da GPx como da GR em eritrócitos de sujeitos treinados em relação aos sedentários, embora a glutathiona total (GSH + GSSG) estivesse aumentada no grupo que realizou o protocolo de treinamento.

No presente estudo, a ausência de alteração na atividade da GR no grupo CT corrobora a teoria anteriormente descrita de que essa via talvez esteja sendo pouco utilizada, devido a um papel predominante da catalase. Alternativamente, caso a captação de GSH pelas células musculares treinadas esteja aumentada, um aumento da GR não seria indispensável para o gastrocnêmio. Em relação aos animais que receberam monocrotalina, a atividade dessa enzima mostrou-se reduzida. Como a GR precisa de NADPH para atuar, é possível que essa esteja reduzida na doença, reforçando a necessidade de ativar mais a catalase. Além disso, nos animais que receberam a droga (grupo MT), o treinamento físico não alterou esses parâmetros. Embora isso pudesse contribuir para um desequilíbrio do estado redox celular, não observamos uma diminuição na relação das glutathionas desse grupo.

Levando em conta os dados discutidos até o momento, possuímos, resumidamente, a seguinte situação: os animais doentes que realizaram treinamento físico apresentaram uma concentração de peróxido de hidrogênio elevada, provavelmente ocasionada pela monocrotalina e pelo exercício físico em conjunto. Entretanto, esse aumento foi acompanhado pela maior atividade e/ou expressão de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathiona peroxidase. Já em relação aos animais doentes sedentários, esses também aumentaram sua produção de peróxido de hidrogênio. Todavia, não ocorreu uma compensação de suas enzimas redutoras como ainda houve uma queda na atividade da glutathiona peroxidase. Isso nos levou ao questionamento do dano celular que essa condição poderia provocar.

Como esperávamos, a análise de dano por quimiluminescência mostrou que a lipoperoxidação nos animais monocrotalina sedentários era maior que a dos controles sedentários. Quando os animais com monocrotalina realizavam exercício físico, esse dano diminuiu significativamente para os níveis de controle sedentário, indicando que o treinamento reduziu o dano oxidativo no músculo esquelético provocado pela doença. Além disso, nos animais do grupo controle treinado, a lipoperoxidação foi ainda menor em relação aos animais controles sedentário. Esse último resultado foi semelhante a um estudo de PINHO e colaboradores (2006), em que ratos treinados apresentaram uma diminuição no dano a lipídios em decorrência de uma maior reserva antioxidante gerada a longo prazo, o que constitui uma consequência benéfica para a célula. Todavia, há estudos que não demonstram alteração do dano com o exercício físico (RADÁK et al., 1999). Nesses casos, há a hipótese de que o principal efeito do exercício é manter um balanço entre uma produção aumentada de antioxidantes frente a um dano provocado nas membranas pelo estresse oxidativo. Nessa hipótese, o dano lipídico seria fundamental para ser o estímulo à produção de agentes que combatem o estresse oxidativo.

Ainda em relação a esses dados, é importante notar que, nos animais doentes que treinaram (MT), enquanto o dano lipídico voltou a diminuir, chegando a níveis de controle, a atividade da GPx aumentou. De acordo com um estudo de Pereira e colaboradores (1994), em que foram analisadas as atividades de diferentes enzimas antioxidantes em diversos tecidos de ratos treinados e não treinados, existe uma relação inversa entre a lipoperoxidação e os níveis de GPx em todos os tecidos analisados (nódulos linfáticos, timo, gastrocnêmio e sóleo), demonstrando que essa enzima exerce um controle fino da concentração de lipoperóxidos dentro das células. Para resumir todas as informações encontradas, um esquema sugerindo as adaptações ocorridas são demonstradas abaixo (figuras 22, 23 e 24).

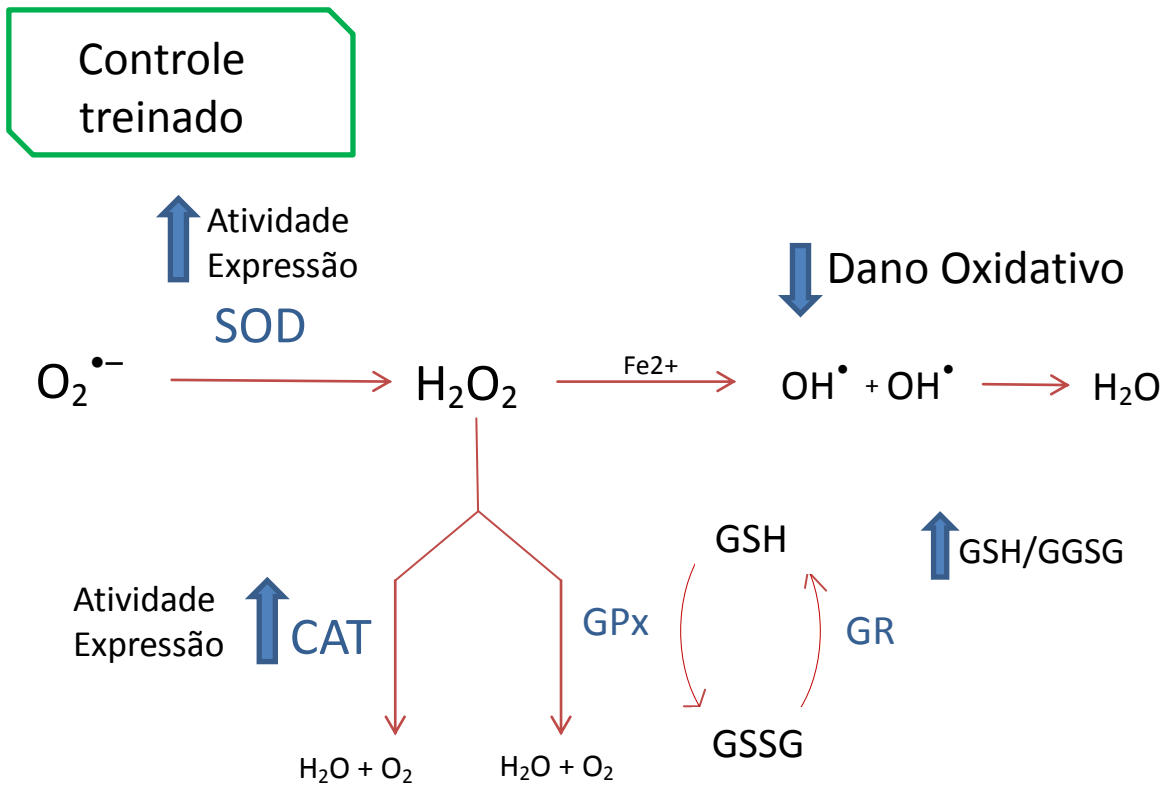


Figura 22. Esquema de alterações do sistema antioxidante no grupo controle treinado.

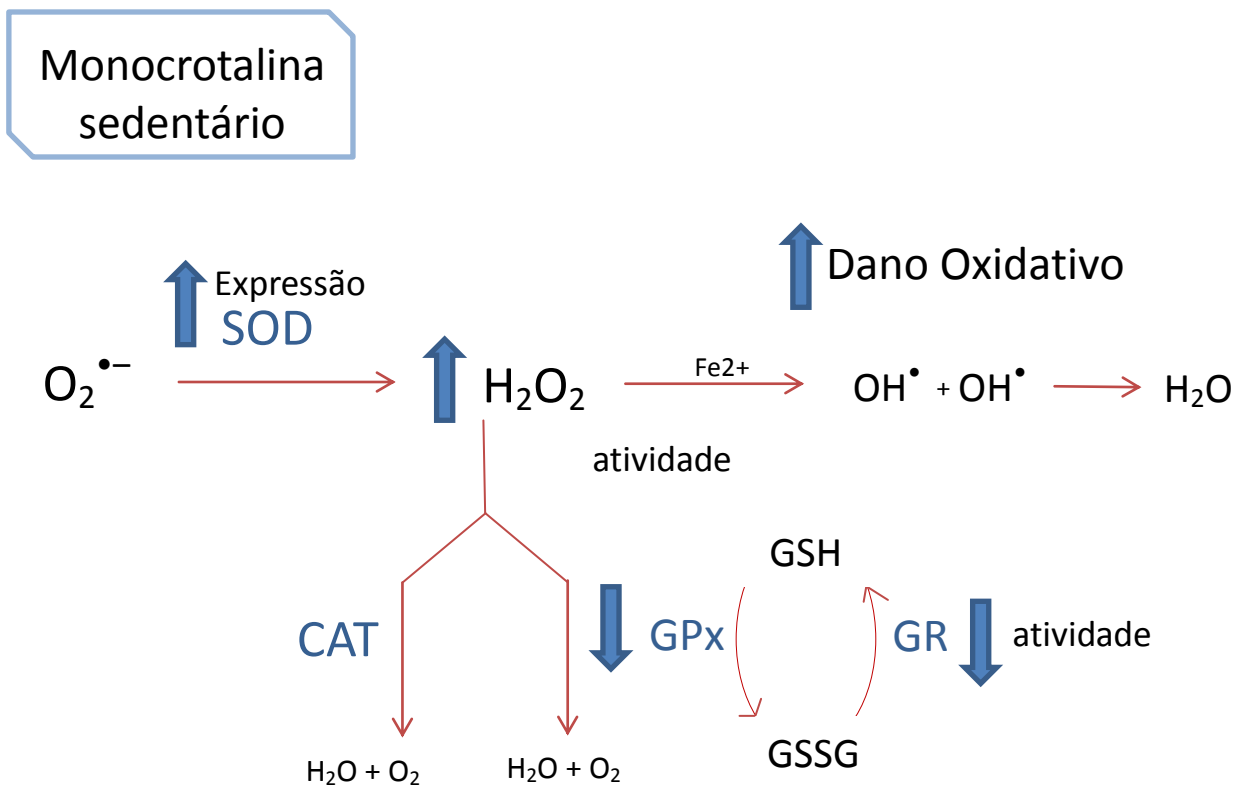


Figura 22. Esquema de alterações do sistema antioxidante no grupo monocrotalina sedentário.

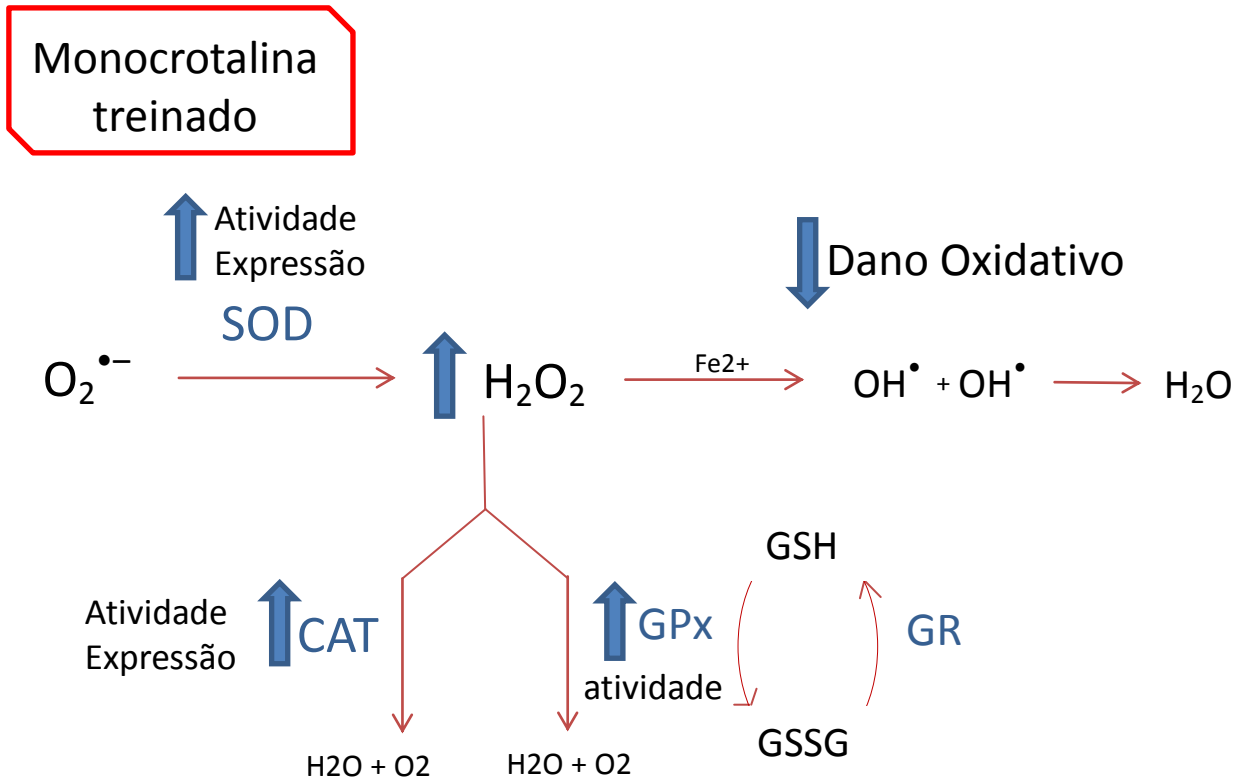


Figura 24. Esquema de alterações do sistema antioxidante no grupo monocrotalina treinado

7 CONCLUSÕES

Os resultados do estudo permitem concluir que, no músculo gastrocnêmio:

- A hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, a exemplo do peróxido de hidrogênio.

- O aumento de peróxido de hidrogênio não é acompanhado por um aumento da atividade de enzimas que o removam, isto é, catalase e glutathione peroxidase, nos animais que permanecem sedentários. Este sistema antioxidante encontra-se, inclusive, menos eficiente, em função da menor atividade da GPx.

- O exercício físico a longo prazo, apesar de não diminuir a concentração de peróxido de hidrogênio, aumenta a expressão e/ou atividade das enzimas que o removem, inclusive da GPx.

- A maior presença de antioxidantes nos animais com monocrotalina que treinaram pode explicar a ausência de lipoperoxidação nesse grupo, diferente dos animais sedentários que também receberam a droga, nos quais o dano aumentou.

Analisando em conjunto todos os dados discutidos, percebemos claramente que há um desequilíbrio entre a produção de espécies ativas de oxigênio e a sua regulação pelo sistema antioxidante na musculatura esquelética dos animais com hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina que permaneceram sedentários. Por outro lado, o exercício físico mostrou ser uma ferramenta benéfica para esses animais, na medida em que aumentou as defesas antioxidantes, tanto pela atividade como pela expressão de enzimas, determinando uma diminuição do dano celular no músculo gastrocnêmio. Nesse sentido, o presente trabalho foi o primeiro a evidenciar, nesse tecido, que o estado oxidativo encontra-se elevado no modelo de hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina e que o exercício modula esse estresse. Ainda assim, futuras investigações devem ser realizadas a fim de melhor entendermos esse processo e se o estresse oxidativo exerce papel singular na disfunção esquelética dessa população.

8 REFERÊNCIAS

AGUILÓ, A. et al. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiology & Behavior*. Vol. 84, p. 1–7, 2005.

AKERBOOM, T. P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in Enzymology*. V. 77, p. 373-382, 1981.

ALESSIO, H.; GOLDFARB, A. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. *Journal of Applied Physiology*. Vol. 64, p. 1333 – 36, 1984.

ATCHLEY, A. E. J.; DOUGLAS, P. S. Left Ventricular Hypertrophy in Athletes: Morphologic Features and Clinical Correlates. *Cardiology Clinics*. Vol. 25(3), p. 371–382, 2007.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.B., DAVID, J.P. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. Vol. 29, No. 1, p. 113-23, 2006.

BERNOCCHI, P. et al. Skeletal muscle abnormalities in rats with experimentally induced heart hypertrophy and failure. *Basic Research in Cardiology*. Vol. 98(2), p. 114-23, 2003.

BOGAARD, H.J. et al. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest*. Vol. 135(3), p. 794-804, 2009.

BOUITBIR, J. et al. Mitochondria of trained skeletal muscle are protected from deleterious effects of statins. *Muscle Nerve*. Vol. 46, p. 367-73, 2012.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochemistry*. Vol. 134, p. 707-716, 1973.

BUDEV, M.M.; ARROLIGA, A.C.; JENNINGS, C.A. Diagnosis and evaluation of pulmonary hypertension. *Cleveland Clinical Journal of Medicine*. Vol. 70 Supplement 1: p. 9-17, 2003.

CALLAHAN D.M.; TOTH M.J. Skeletal muscle protein metabolism in human heart failure. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. Vol. 16(1), p. 66-71.

COLOMBO, R et al. Effects of exercise on monocrotaline-induced changes in right heart function and pulmonary artery remodeling in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. Vol. 91(1), p. 38-44, 2013.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*. Vol. 113, p. 379–390, 1985.

COUILLARD, A. et al. Exercise-induced Quadriceps Oxidative Stress and Peripheral Muscle Dysfunction in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal Respir Crit Care Med*. V167, p.1664–1669, 2003.

DAUSSIN, F.N. et al. Training at high exercise intensity promotes qualitative adaptations of mitochondrial function in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, Vol. 104(5), p. 1436-41, 2008.

DAVIES K,J. et al. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 107, p. 1198–1205, 1982.

DE MAN, F. S. et al. Effects of exercise training in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal*. Vol. 34. P. 669–675, 2009.

DEL MAESTRO, R.F. An approach to Free Radicals in Medicine and Biology. *Acta Physiologica Scandinavica*. Supplement 492, p. 153-168, 1980.

DEMARCO, V.G. et al. Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial Hypertension. *World Journal of Cardiology*. Vol. 2(10), p. 316-24, 2010.

DENG, Z. et al. Familial Primary Pulmonary Hypertension (Gene PPH1) Is Caused by Mutations in the Bone Morphogenetic Protein Receptor-II Gene. *The American Journal of Human Genetics*. V. 67(3), p. 737-744, 2000.

DOUGLAS, P. S. et al. Left ventricular hypertrophy in athletes. *American Journal of Cardiology*, Vol. 80, p. 1384-1388, 1997.

EDIBERTO, N.; OLIVEIRA, S. de C. e MORAIS, R. N. Radicais livres: conceito, doenças, estresse oxidativo e antioxidantes. Disponível em www.centrodeestudos.org.br/pdfs/oxidativo.pdf. Data de acesso: 29/04/2010.

FARAHMAND, F., HILL, M.F.; SINGAL, P. K. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. *Molecular and Cellular Biochemistry*. Vol. 260, p. 21-29, 2004.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. Vol. 408, p. 239-47, 2000.

FLOHÉ, L.; GUNZLER W. A. Assay of Glutathione Peroxidase. *Methods in Enzymology*. Vol. 105, p. 114-121, 1984.

FRANCO, A. A.; ODOM, R. S.; RANDO, T. A. Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radicals Biology*. Vol. 27, p. 1122-1132, 1999.

FRAZIER, A. A.; BURKE, A. P. The Imaging of Pulmonary Hypertension. *Seminars in Ultrasound, CT, and MRI*. Vol. 33(6), p. 535-51, 2012.

GAINES, S. P.; RUBIN L. J. Primary pulmonary hypertension. *Lancet*. Vol. 352(9129), p. 719-25, 1998.

GHORAYEB, M. N. et al. Left ventricular hypertrophy in athletes: adaptive physiologic response of the heart. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. Vol. 85, p. 191–197, 2005.

GOLDIM, J. R.; RAIMUNDO, M. M. Pesquisa em saúde e direito dos Animais 2ª ed. HCPA, Porto Alegre, RS, 1997.

GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart and muscle. *Free Radical Biology & Medicine*. Vol. 10, p. 41-47, 1991.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBI, W. B. Glutathione S-Transferases. *The Journal of Biology Chemistry*. Vol. 249, p. 7130-7139, 1974.

HALLIWELL, B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutation Research*. Vol. 443, p. 37–52, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. 3 ed. New York: Oxford, 1999.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. *Lancet*. Vol. 355, P. 1179-1180, 2000.

HAMBRECHT, R. et al. Physical training in patients with stable chronic heart failure: effects on cardiorespiratory fitness and ultrastructural abnormalities of leg muscles. *Journal of the American College of Cardiology*. Vol. 25, p. 1239-49, 1995.

HAMBRECHT, R. et al. Effects of exercise training on insulin-like growth factor-I expression in the skeletal muscle of non-cachectic patients with chronic heart failure. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation*. Vol, 12, p. 401-6, 2005.

HANDOKO M. L. et al. Opposite effects of training in rats with stable and progressive pulmonary hypertension. *Circulation*. v. 120, p. 42-9, 2009.

HENKENS, I. R. Early changes in rat hearts with developing pulmonary arterial hypertension can be detected with three-dimensional electrocardiography. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. Vv. 293, p. 1300-1307, 2007.

HIGUCHI, M.; CARTIER, L. J.; CHEN, M.; HOLLOSZY, J. O. Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise. *Journal of Gerontology*. Vol. 40, p. 281-286, 1985.

HILL, N. S.; JEDERLINIC, P.; GAGNON, J. Supplemental oxygen reduces right ventricular hypertrophy in monocrotaline-injected rats. *Journal Applied of Physiology*. Vol. 66(4), p. 1642-48, 1989.

HUMBERT, M. et al. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation*. Vol. 122(2), p. 156-63, 2010.

JASMIN, J. F; CERNACEK, P.; DUPUIS, J. Activation of the right ventricular endothelin (ET) system in the monocrotaline model of pulmonary hypertension: response to chronic ETA receptor blockade. *Clinical Science*. Vol. 105, p. 647-653, 2003.

JENKINS, R. The role of superoxide dismutase and catalase in muscle fatigue. Em *Biochemistry of Exercise*, Vol.13, p. 467-471 [H Knuttgen, editor]. Champaign, IL: Human Kinetics Publishers.

JONES, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. Vol. 295, p. 849-68, 2008.

JONG, J. W. et al. Enhanced expression and activity of xantine oxidoreductase in the failing heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Vol. 32, p. 2083-89, 2000.

KANETO, H. et al. Role of Reactive Oxygen Species in the Progression of Type 2 Diabetes and Atherosclerosis. *Mediators of inflammation*. Vol. 2010, 11 páginas, 2010.

KAUL, N. et al. Free radicals and the heart. *Journal of Pharmacology and Toxicology Methods*. Vol. 30, p. 55-67, 1993.

KAYATEKIN, B. M. et al. Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. *European Journal of Applied Physiology*. Vol. 87, p.141–44, 2002.

KOJDA, G.; HAMBRECHT, R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovascular Research*. Vol. 67, p. 187-97, 2005.

LAMÉ, M. et al. Metabolism of ¹⁴C-monocrotaline by isolated perfused rat liver. *Drug Metabolism and Disposition*. Vol. 19(2), p. 516-524, 1991.

LAUGHLIN M. H. et al. Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training. *Journal of Applied Physiology*. Vol. 68, p. 337–343, 1990.

LEEUWENBURGH, C. et al. Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *American Journal of Physiology*. Vol. 267, p. R439–R445, 1994.

LEEUWENBURGH, C. et al. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *American Journal of Physiology*. Vol. 272, p. R363–R369, 1997.

LEICHSENRING-SILVA, F. et al. Association of the time course of pulmonary arterial hypertension with changes in oxidative stress in the left ventricle. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. Vol 38, p. 804–810, 2011

LINKE, A. Increase in Radical Scavenger Enzyme Activity in Skeletal Muscle Antioxidative Effects of Exercise Training in Patients With Chronic Heart Failure. *Circulation*. Vol. 111, p. 1763-1770, 2005.

LLESUY, S. F.; et al. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori*. Vol. 71, p. 241-249, 1985.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 193, p. 265-75, 1951.

LÜDKE, A. R. Avaliação da administração de suco de uva e modelo experimental de hipertensão pulmonar – papel do óxido nítrico e estresse oxidativo. 2007. 126f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

LÜDKE A. R. et al. Modulation of monocrotaline-induced cor pulmonale by grape juice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. Vol. 55(1), p. 89-95, 2010.

MACNEE, W. The clinical importance of right ventricular function in pulmonary hypertension. In: Weir EK; Archer SL & Reeves JT, eds. The diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. Futura, New York, p. 13-40, 1992.

MARKLUND, S. Handbook of methods for oxygen radical research. *CRC Press online*. p. 243-247, 1985.

MARON, B. J. Structural features of the athlete heart as defined by echocardiography *Journal of the American College of Cardiology*, Vol. 7, p 190–203, 1986.

MATHEW, R.; ZEBALLOS, G.A.; TUN, H.; GEWITZ, M.H. Role of nitric oxide and endothelin-1 in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Cardiovascular Research*. Vol. 30, p. 739-746, 1995.

MEISTER, A; ANDERSON, M. E. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*. Vol. 52, p. 711-60, 1983.

MERELES D. et al. Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Circulation*. Vol. 114(14), p. 1482-9, 2006.

MENEGHINI, R. A toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje* 5(6): 57-62, 1987.

MOHAMMADI, S. et al. Protective Effects of Methylsulfonylmethane on Hemodynamics and Oxidative Stress in Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertensive Rats. *Advances in Pharmacological Sciences*. Vol. 2012, p. 1-6, 2012.

MONNET, E.; CHACHQUES, J.C. Animal models of heart failure: What is new? *The Annals of Thoracic Surgery*. Vol 79, p. 1445-53, 2005.

NAUSER, T. D.; STEVEN, W. S. Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension. *American family physician*. Volume 63, n. 9, p. 1789-98, 2001.

OH-ISHI, S. et al. Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content and mRNA expression in rat muscle. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. Vol. 5, p. 326–332, 1997.

OKADA, M. et al. Captopril attenuates matrix metalloproteinase -2 and -9 in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in rats. *Journal of Pharmacological Sciences*. Vol. 108, p. 487-494, 2008.

PADMAVATI, S.; PATHAK, S. N. Chronic Cor Pulmonale in Delhi : A Study of 127 Cases. *Circulation*. Vol. 20, p. 343-352, 1959

PAFFET, M. L. et al. Cardiac and Vascular Atrogin-1 mRNA Expression is Not Associated with Dexamethasone Efficacy in the Monocrotaline Model of Pulmonary Hypertension. *Cardiovascular Toxicology*. Vol, 12, p.226–234, 2012

PALEVSKY, H. I.; FISHMAN, A. P. Chronic Cor Pulmonale: Etiology and Management. *Journal of American Medical Association*. Vol. 263, p. 2347-53, 1990.

PAN, L. C. et al. Cor pulmonale is caused by monocrotaline and dehydromonocrotaline, but not by glutathione or cysteine conjugates of dihydropyrrrolizine. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Vol. 118, p. 87-97, 1993.

PEREIRA, B. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in muscle and lymphoid organs of sedentary and exercise-trained rats. *Physiology & Behavior*. Vol. 56, p. 1095-9, 1994.

PICHARDO, J. et al. Myocardial oxidative stress changes during compensated right heart failure in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. V. 196, p. 51-57, 1999.

PINHO, R.A. et al. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biology International*. Vol. 30, p. 848-853, 2006.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of Immunological Methods*. Vol. 38, p. 161-170, 1980.

POWERS, S. et al. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology*. Vol. 266, p. R375–R380, 1994.

SCOTT K. POWERS, S. K.; LENNON, S. L. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proceedings of the Nutrition Society*. Vol. 58, p. 1025–1033, 1999.

RADÁK, Z. et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radical Biology & Medicine*. Vol. 27, p. 69-74, 1999.

RICH, S. Executive summary from the World Symposium on Primary Pulmonary Hypertension, Evian, France, September 6-10, 1998, co-sponsored by The World Health Organization. In: BARST, R.J. et al. Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. Vol. 43. p. 40s-47s, 2004.

RODRIGUES, B.; et al. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovascular Diabetology*. Vol. 13, p. 1-7, 2007.

REDOU, E. M. et al. Mitochondrial metabolic adaptation in right ventricular hypertrophy and failure. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. Vol. 298, p. H1038–H1047, 2010.

RUBIN, L. J. Current Concepts: Primary pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine*. Vol. 336(2); p. 111-117, 1997.

SCHANNWELL, C. M.; STEINER, S., STRAUER, B. E. Diagnostics in pulmonary hypertension. *Journal of physiology and pharmacology*. v. 58, p. 591-602, 1997.

SEMIN, I. et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels of intestinal renal and muscle tissues after a 60 minutes exercise in trained mice. *Indian journal of physiology and pharmacology*. Vol. 44(4), p. 419-27, 2000.

SEN, C. K. et al. Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization. *Journal of Applied Physiology*. Vol. 73, p. 1265 – 1272, 1992.

SIMONNEAU, G., et al. Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, Vol. 54; No.1, p. S43-54, 2009.

SINGAL, K. P. et al. Oxidative stress status in the transition of hypertrophy to heart

failure. *Heart Failure Reviews*. v. 4, p. 353-360, 1999.

SINGAL, K. P. et al. Oxidative stress in congestive heart failure. *Current Cardiology Reports*. Vol. 2, n. 3, p. 206-211, 2000.

SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. *Mark's Basic Medical Biochemistry: a clinical approach*. 2^a Ed. Editora Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

SOUZA-RABBO, M. P.; *Efeitos do treinamento físico no perfil hemodinâmico e no estresse oxidativo em modelo experimental Cor pulmonale*. 2005. 70f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005.

SOUZA-RABBO M. P. et al. Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. v. 35, n. 8, p. 944-948, 2008.

SUKHANOV, S. et al. Angiotensin II, oxidative stress and skeletal muscle wasting. *The American Journal of the Medical Sciences*; Vol. 342(2), p.143-7, 2011.

TERBLANCHE S.E. et al. The effects of exhaustive exercise on the activity levels of catalase in various tissues of male and female rats. *Cell Biology International*, Vol. 23, p. 749-53, 2000.

TIIDUS, P. M.; PUSHKARENKO, J.; HOUSTON, M. E. Lack of antioxidant adaptation to short-term aerobic training in human muscle. *American Journal of physiology*. Vol. 271, p. R832-R836, 1996.

TRAVACIO, M.; POLO, J M.; LLESUY, S. Chromium (VI) induces oxidative stress in the mouse brain. *Toxicology*. Vol. 162, p. 139-148, 2001.

VENDITTI, P.; DI MEO, S. Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. *International Journal of Sports Medicine*. Vol 18, p. 497-502, 1997.

VESCOVO, G. et al. Apoptosis of skeletal muscle myofibers and interstitial cells in experimental heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Vol. 30, p. 2449-59, 1998a.

VESCOVO, G. et al. Skeletal muscle myosin heavy chain expression in rats with monocrotaline-induced cardiac hypertrophy and failure. Relation to blood flow and degree of muscle atrophy. *Cardiovascular Research*. Vol. 39(1), p. 233-41, 1998b.

WILSON, D.W. et al. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*. Vol. 22, p. 307-25, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chronic cor pulmonale. A report of the expert committee. *Circulation* 2: 594-598, 1963.

YAMAZATO, Y. et al. Prevention of Pulmonary Hypertension by Angiotensin-Converting Enzyme 2 Gene Transfer. *Hypertension*. Vol. 54, p. 365-371, 2009.

ZAMBELLI, V. et al. Efficacy of aminaftone in a rat model of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *European Journal of Pharmacology*. Vol. 667, p. 287-291, 2011.