

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

Adriana Conzatti

**EFEITOS DO SULFORAFANO SOBRE O REMODELAMENTO DO VENTRÍCULO
DIREITO E ESTADO REDOX EM MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL
PULMONAR**

Porto Alegre

2016

Adriana Conzatti

**EFEITOS DO SULFORAFANO SOBRE O REMODELAMENTO DO VENTRÍCULO
DIREITO E ESTADO REDOX EM MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL
PULMONAR**

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.

Orientador: Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo

Porto Alegre

2016

Aos meus pais, Nilson e Lourdes Conzatti, que não puderam estudar, mas que trabalharam duro para que eu pudesse.

AGRADECIMENTOS

Registro minha gratidão ao meu orientador Alex Sander da Rosa Araujo, que exerceu o seu papel de maneira exemplar. Por ter sido além de uma referência acadêmica e profissional, uma referência de ética e humanidade. Agradeço pela confiança depositada em mim desde os anos de iniciação científica. Pelos conselhos, pela compreensão nos momentos de dificuldades, pelo apoio nas minhas decisões, incentivo e respeito. Acima de tudo, pelo exemplo de profissionalismo que levo para a vida.

Compartilho o mérito deste trabalho com os colegas que colaboraram para a sua realização, aos quais sou muito grata. Ao Rafael Colombo, pela realização das análises ecocardiográficas; Tânia Regina Gatelli Fernandes, Cristina Campos Carraro e Vanessa Duarte Ortiz, pelo auxílio nos experimentos; Rafaela Siqueira, pelo apoio desde a injeção de monocrotalina até a impressão da dissertação.

À professora Adriane Belló-Klein, pela generosidade e acolhida no laboratório, pelas oportunidades e por todo o aprendizado proporcionado nestes anos.

À professora Maria Flávia Marques Ribeiro que despertou em mim o interesse e o gosto pela Fisiologia, e que é uma inspiração para a vida acadêmica.

À Tânia Regina Gatelli Fernandes, pela amizade, disponibilidade, dedicação, generosidade e principalmente pelo carinho e cuidado.

Aos colegas que passaram pelo laboratório e se tornaram amigos, com quem pude trabalhar e aprender, especialmente Rafaela Siqueira, Dhâniel Baraldi, Rafael Colombo, Bruno Berger, Amanda Martins e Alexandre Luz de Castro.

Minha família, namorado e amigos foram fundamentais para a realização deste mestrado. Agradeço ao André, Maristela, Pedro, Bruno e Maria Helena, pelo incentivo, suporte emocional e compreensão.

Agradeço especialmente aos meus pais, Nilson e Lourdes Conzatti, que nunca mediram esforços para me oferecer as melhores condições de vida e de estudos e que foram meus maiores professores.

RESUMO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença grave, caracterizada pelo aumento na resistência vascular pulmonar, elevando a pós-carga imposta ao ventrículo direito. Na tentativa de compensar o aumento da pós-carga, o ventrículo direito desenvolve hipertrofia, que pode evoluir para dilatação e insuficiência, síndrome conhecida como *Cor pulmonale*. Alterações no estado redox estão presentes na HAP e estão relacionadas ao remodelamento e insuficiência do ventrículo direito. Desta forma, as espécies reativas de oxigênio podem ser alvos terapêuticos interessantes na HAP. O sulforafano é um fitoquímico que vem sendo largamente estudado pelo seu potencial de indução de enzimas antioxidantes. Dessa forma, este estudo analisou a influência do tratamento com sulforafano sobre o remodelamento do ventrículo direito e estado redox em um modelo experimental de HAP induzido por monocrotalina. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovado sob o número 26270. Foram utilizados ratos Wistar machos, separados em quatro grupos (n=10-12 animais/grupo): controle (C); Controle + Sulforafano (CS); Monocrotalina (M); Monocrotalina + Sulforafano (MS). A indução da HAP foi realizada por meio de uma dose única de monocrotalina (60 mg/kg – i.p.). O tratamento com sulforafano (2,5 mg/kg i.p.) foi iniciado no 7º dia após a injeção de monocrotalina até 20º dia. Após 21 dias da indução da HAP, os ratos foram anestesiados e foi realizada ecocardiografia, cateterismo e eutanásia dos animais. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias e pós-teste de Student Newman Keuls (nível de significância $P < 0,05$). A administração de monocrotalina provocou aumento da resistência vascular pulmonar, resultando em hipertrofia do ventrículo direito, aumento das pressões diastólica e sistólica do ventrículo direito e da pressão média da artéria pulmonar, da $+dP/dt$ e $-dP/dt$. Dentre as alterações provocadas pela monocrotalina que foram observadas na ecocardiografia, destacam-se a diminuição da fração de encurtamento e da excursão sistólica do plano do anel da tricúspide (TAPSE). O tratamento com sulforafano atenuou o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca e o aumento na resistência vascular pulmonar. Os animais MS mostraram uma redução na pressão sistólica (~19%) e na pressão média da artéria pulmonar (~17%) em relação ao grupo M. O TAPSE pode ser considerado um indicativo de prognóstico nos

pacientes com HAP e no grupo MS esta variável foi ~17% maior em comparação com o grupo M. As análises bioquímicas no ventrículo direito mostraram aumento na concentração de H_2O_2 e da atividade da glutathiona peroxidase, redução na atividade da catalase e na expressão da heme-oxigenase-1 e uma importante redução na razão GSH/GSSG pela monocrotalina. O principal efeito do tratamento com sulforafano foi a manutenção da razão GSH/GSSG, um indicador do estado redox celular. Os resultados deste trabalho mostraram um modesto benefício do tratamento com sulforafano na função cardíaca de ratos com HAP induzida por monocrotalina, que pode estar relacionado com a manutenção do estado redox celular.

Palavras-chave: Hipertensão arterial pulmonar. Monocrotalina. Sulforafano. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a serious disease characterized by an increase in pulmonary vascular resistance, increasing afterload imposed on the right ventricle. In an attempt to offset the increased afterload, right ventricular hypertrophy develops, which may progress to dilatation and failure, syndrome known as *Cor pulmonale*. Alterations in redox state are present in PAH and are related to remodeling and right ventricular failure. Thus, reactive oxygen species may be interesting drug targets in PAH. Sulforaphane is a phytochemical that has been widely studied for its potential induction of antioxidant enzymes. Thus, this study examined the influence of treatment with sulforaphane on the remodeling of the right ventricle and redox state in an experimental model of PAH-induced monocrotaline. The project was submitted to the Comitê de Ética em Pesquisa com Animais of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul and approved under number 26270. Male Wistar rats were divided into four groups (n = 10-12 animals/group): Control (C); Control + Sulforaphane (CS); Monocrotaline (M); Sulforaphane + Monocrotaline (MS). Induction of PAH was performed by a single dose of monocrotaline (60 mg/kg - i.p.). The treatment with sulforaphane (2.5 mg/kg i.p.) was initiated on day 7 after injection of monocrotaline to 20 days. After 21 days of induction of PAH, rats were anesthetized and was performed echocardiography, catheterization and euthanasia of the animals. Results were analyzed by two-way ANOVA and Student Newman Keuls post-test (significance level $P < 0.05$). The monocrotaline administration caused an increase in pulmonary vascular resistance, resulting in right ventricular hypertrophy, increase in diastolic and systolic pressure of the right ventricle and mean pulmonary artery pressure, + dP/dt and -dP/dt. Among the changes caused by monocrotaline that were observed on echocardiography, we highlight the decrease in fractional shortening and Tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE). The treatment with sulforaphane attenuates the development of cardiac hypertrophy and an increase in pulmonary vascular resistance. MS animals showed a decrease in systolic pressure (~ 19%) and mean pulmonary artery pressure (~ 17%) compared to the M. TAPSE can be regarded as a prognostic indicator in patients with PAH and in MS group is variable was ~ 17% higher compared to the group M. Biochemical analyzes in the right ventricle showed an increase in the concentration of H₂O₂ and glutathione peroxidase activity, reduced catalase activity and expression of heme

oxygenase-1 and a significant reduction in the GSH/GSSG ratio by monocrotaline. The main effect of treatment with sulforaphane was maintaining the GSH / GSSG ratio, a cellular redox indicator. The results of this study showed a modest benefit of treatment with sulforaphane on cardiac function of rats with PAH monocrotaline induced, which can be related to the maintenance of cellular redox state.

Keywords: Pulmonary arterial hypertension. Monocrotaline. Sulforaphane. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da hidrólise da glicorafanina mediada pela enzima mirosinase	28
Figura 2 – Cronograma experimental	34
Figura 3 – Massa corporal dos animais	45
Figura 4 – Massa corporal dos animais no dia 7	46
Figura 5 – Massa corporal dos animais no dia 21	46
Figura 6 – Índice de hipertrofia do Ventrículo direito	47
Tabela 1 – Avaliação da Congestão Pulmonar e Hepática em animais controle e com monocrotalina, tratados ou não com sulforafano.....	48
Tabela 2 – Avaliação do volume sistólico e débito cardíaco em animais controle e com monocrotalina, tratados ou não com sulforafano	48
Figura 7 – Figura ilustrativa de ecocardiografia Doppler contínuo do fluxo na artéria pulmonar	49
Figura 8 – Razão entre o tempo de aceleração (TAc) pelo tempo de ejeção (TEj) do fluxo pela artéria pulmonar	50
Figura 9 – Razão entre as velocidades máximas do enchimento rápido e lento do ventrículo direito	51
Figura 10 – TAPSE (Excursão sistólica do plano anular da tricúspide)	52
Figura 11 – Figura ilustrativa do TAPSE (Excursão Sistólica do Plano do Anel da Tricúspide) obtido por ecocardiografia Modo M	53
Figura 12 – Área do Ventrículo direito na Sístole.....	54
Figura 13 – Área do Ventrículo Direito na Diástole	54
Figura 14 – % do diâmetro do VE	55
Figura 15 – Fração de encurtamento do Ventrículo Direito (FEC)	56
Figura 16 – Variação fracional da área do Ventrículo Direito (FAC)	56
Figura 17 – Índice de Performance do Miocárdio (IPM)	57
Figura 18 – Pressão Sistólica do Ventrículo Direito	58
Figura 19 – Pressão Diastólica Final do Ventrículo Direito	58
Figura 20 – Pressão Média na Artéria Pulmonar	59
Figura 21 – Resistência Vascular Pulmonar	60
Figura 22 – Índice de Contratilidade (+dP/dt)	60

Figura 23 – Índice de Relaxamento (-dP/dt)	61
Figura 24 – Concentração de Peróxido de Hidrogênio	62
Figura 25 – Atividade da enzima Superóxido Dismutase	63
Figura 26 – Atividade da enzima Catalase	63
Figura 27 – Atividade da enzima Glutathione Peroxidase	64
Figura 28 – Concentração de Glutathione Total	64
Figura 29 – Concentração de Glutathione Reduzida (GSH)	65
Figura 30 – Estado redox (GSH/GSSG)	66
Figura 31 – Lipoperoxidação por quimiluminescência	66
Figura 32 – Imunoconteúdo da proteína Heme-oxigenase-1 (HO-1)	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Akt – Proteína kinase B

ARE – Elemento de resposta antioxidante

C – Grupo Controle

CAT – Catalase

CS – Grupo Controle com Sulforafano

+dP/dt – Derivada de Contratilidade

-dP/dt – Derivada de Relaxamento

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

ERK1/2 – Proteína quinase regulado por sinal extracelular 1/2

EROs – Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

ESP – *epithiospecifier*

FGF-2 – Fator de crescimento de fibroblasto-2

GPx – Glutaciona peroxidase

GR – Glutaciona redutase

Grx – Glutarredoxina

GSH – Glutaciona reduzida

GSSG – Glutaciona oxidada

GST – Glutaciona s-transferase

GSTM1 – Glutaciona-S-transferase M1

GSTP1 – Glutaciona-S-transferase P1

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HAP – Hipertensão Arterial pulmonar

HO-1 – Heme oxigenase-1

HP – Hipertensão Pulmonar

IHC – Índice de Hipertrofia Cardíaca

IPM – índice de performance miocárdica do ventrículo direito

Keap1 – *Kelchlike ECH-associated protein 1*

M – Grupo Monocrotalina

MS – Grupo Monocrotalina com Sulforafano

NADPH – Adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NO – Óxido nítrico prostaciclina (PGI₂)

NQO1 – NADPH quinona oxidoreductase

Nrf-2 – NF-E2-*related fator 2*

O₂^{•-} – Ânion radical superóxido

OH[•] – Radical hidroxil

ONOO⁻ – Peroxinitrito

p38MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno p38

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

PGC-1 α – Coativador-1 α do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma

PMAP – Pressão Média da Artéria Pulmonar

Prx – Peroxiredoxina

RVP – Resistência vascular pulmonar

SFN – Sulforafano

SOD – Superóxido dismutase

TAc – Tempo de aceleração

TAPSE – Excursão sistólica do plano anular da tricúspide

TEj – Tempo de ejeção

TGF- β 1 – Fator de crescimento tumoral- β 1

TR – Tiorredoxina redutase

Trx – Tiorredoxina

VD – Ventrículo Direito

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR	14
1.2. ESTRESSE OXIDATIVO	22
1.3. SULFORAFANO.....	26
2. HIPÓTESE.....	31
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. OBJETIVO GERAL.....	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1. EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	33
4.2. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	33
4.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	34
4.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	34
4.5. INDUÇÃO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR.....	35
4.6. ADMINISTRAÇÃO DO SULFORAFANO	35
4.7. EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	35
4.8. AVALIAÇÃO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR ATRAVÉS DE PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS	36
4.9. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA POR ECOCARDIOGRAFIA	37
4.10. AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA POR REGISTRO DE PRESSÃO VENTRICULAR DIREITA ..	38
4.11. ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO	39
4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5. RESULTADOS	45
5.1. AVALIAÇÃO DA HAP ATRAVÉS DE PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS	45
5.2. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA ATRAVÉS DE ECOCARDIOGRAFIA	48
5.3. AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA POR REGISTRO DE PRESSÃO VENTRICULAR DIREITA	57

5.4. ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO	61
6. DISCUSSÃO	68
7. CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS.....	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

1.1.1. Definição e Epidemiologia

A condição conhecida como hipertensão pulmonar (HP) engloba um conjunto de doenças que preenchem como critério básico ter uma pressão média da artéria pulmonar (PMAP) igual ou superior a 25 mmHg em repouso, medida através de cateterismo cardíaco, sendo frequentemente associada com outras doenças, predominantemente doença cardíaca do ventrículo esquerdo e doença pulmonar (HOEPER et al., 2013).

Dentre o grupo de doenças chamadas hipertensão pulmonar, a hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma subcategoria que compreende um grupo de doenças com patologia vascular pulmonar semelhante. A primeira classificação da hipertensão pulmonar proposta em 1973 apresentava apenas duas categorias, hipertensão pulmonar primária ou HP secundária, dependendo da presença ou ausência de causas identificáveis ou fatores de risco. Em função do estado multifatorial de causas que podem levar à HP, foi proposta, em 2003, uma classificação baseada nas semelhanças patológicas e de resposta ao tratamento. Foram reconhecidas cinco categorias maiores, revisadas e atualizadas em 2013 (SIMONNEUAU et al., 2013).

A categoria 1 é uma síndrome heterogênea em que a hipertensão pulmonar se origina nas pequenas artérias pulmonares; portanto, conhecida como hipertensão arterial pulmonar. A hipertensão arterial pulmonar é uma doença grave e fatal, caracterizada clinicamente pelo aumento da resistência vascular pulmonar, que afeta o coração. A definição hemodinâmica da HAP é uma pressão arterial pulmonar média maior ou igual a 25 mmHg em repouso, na presença de uma pressão capilar pulmonar maior ou igual a 15 mmHg com resistência vascular pulmonar (RVP) superior a 3 unidades Wood (HOEPER, et al., 2013; AWDISH; CAJIGAS, 2015).

A hipertensão pulmonar é uma doença comum, no entanto, a incidência estimada de hipertensão arterial pulmonar idiopática é de 1-3 casos por milhão, tornando-se uma doença rara (AWDISH; CAJIGAS, 2015). A idade média dos

pacientes com HAP idiopática no primeiro registo criado em 1981 (NIH Registry EUA) foi de 36 anos, porém atualmente a HAP é frequentemente diagnosticada em pacientes idosos, resultando em uma média de idade entre 50 e 65 anos. Além disso, a predominância do sexo feminino é bastante variável entre os registros e a sobrevivência dos doentes parece ter melhorado ao longo do tempo (MCGOON, 2013).

Em um estudo realizado na França, a prevalência estimada foi de 15 casos/milhão de adultos, e a incidência de 2,4 casos/milhão de habitantes/ano. A média de idade dos pacientes diagnosticados foi de 52 anos, e a sobrevivência em um ano foi de 88%. No entanto, o diagnóstico da HAP normalmente é realizado em estágios avançados da doença, quando a maioria dos pacientes já exibe um comprometimento funcional e hemodinâmico grave, levando a um prognóstico ruim (HUMBERT et al., 2006).

No recente estudo conduzido por Alves (2015), foi descrito as características de incidência de HAP em pacientes de um grande centro de referência no Brasil. Foram incluídos no estudo todos os pacientes que receberam um diagnóstico de HAP por cateterismo, entre 2008 e 2013, num total de 178 pacientes. A média de idade foi de 46 anos, sendo a maioria mulheres em uma proporção de 3,3:1, e 45% diagnosticados em estágios avançados da doença (classe funcional III ou IV). A HAP idiopática, doenças do tecido conjuntivo e HAP associada à esquistossomose foram responsáveis por 28,7%, 25,8% e 19,7% de todos os casos, respectivamente. Para o grupo HAP como um todo, a taxa de sobrevivência estimada 3 anos após o diagnóstico foi de 73,9% (ALVES et al., 2015).

1.1.2. Fisiopatologia e Remodelamento do Ventrículo Direito

Características histológicas comuns em quase todos os tipos de HAP, que ocorrem nas pequenas artérias pulmonares, incluem hiperplasia da camada íntima, hipertrofia da musculatura lisa vascular, proliferação/fibrose da camada adventícia, oclusão das pequenas artérias, trombose *in situ* e infiltração de células inflamatórias (CHAN; LOSCALZO, 2008; ARCHER; WIER; WILKINS, 2010).

Acredita-se que o primeiro componente do processo hipertensivo pulmonar seja a vasoconstrição, que estimula o remodelamento vascular através de processos celulares patológicos (CHAN; LOSCALZO, 2008). A vasoconstrição excessiva tem sido relacionada a alterações na expressão e função de canais de potássio e a um desequilíbrio na secreção de fatores vasoativos do endotélio, com uma diminuição na produção de vasodilatadores como o óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI₂) e um aumento na produção de vasoconstritores como a endotelina-1. Essas alterações não só aumentam o tônus vascular e promovem o remodelamento dos vasos bem como são os alvos dos medicamentos disponíveis (HUMBERT et al., 2004).

Outros componentes envolvidos na patogênese da hipertensão arterial pulmonar são o processo inflamatório, a resistência celular à apoptose e as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs). Macrófagos, linfócitos B e T e células dendríticas estão presentes nas lesões vasculares e tem sido alvos de estudos clínicos que buscam novas alternativas terapêuticas (HASSOUN et al., 2009).

A vasculatura é uma importante fonte de espécies reativas e o aumento da produção de EROs encontrado na HAP deve-se à disfunção mitocondrial e alterações nas atividades das enzimas óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) desacoplada, NADPH oxidase e xantina oxidase. O aumento nas concentrações de EROs promove a vasoconstrição por diminuir a produção de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais e alterar a função de canais de potássio voltagem dependentes (Kv1.5, Kv2.1), levando a um aumento no K⁺ intracelular e influxo de Ca²⁺ através da ativação de canais de cálcio voltagem dependentes. Além disso, as EROs promovem a vasoconstrição através do aumento da produção de endotelina-1 e tromboxano A₂, e diminuição nos níveis de prostaciclina, um vaso dilatador (AGGARWAL et al., 2013).

A participação das EROs na sinalização para a proliferação do endotélio e espessamento da camada muscular envolve a expressão de vários fatores de crescimento, tais como fator de crescimento tumoral-β1 (TGF-β1), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblasto-2 (FGF-2) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Além disso, EROs estimulam a proteína kinase B (Akt), que promove a proliferação das células musculares lisas por meio da regulação positiva da PGC-1α e a ativação da via de sinalização da p38MAPK e ERK1/2 (AGGARWAL et al., 2013). A sinalização

mediada pelas EROs está envolvida não só no remodelamento vascular pulmonar, bem como na hipertrofia e disfunção contrátil do ventrículo direito (REDOUT et al., 2010).

As alterações vasculares provocam um aumento progressivo da resistência vascular pulmonar, que pode levar a uma sobrecarga de pressão imposta ao ventrículo direito, promovendo o aparecimento da síndrome conhecida como *Cor Pulmonale*, caracterizada pela dilatação e disfunção do ventrículo direito (LEHRMAN et al., 2002).

A vasculatura pulmonar é um sistema de baixa pressão que apresenta cerca de um décimo da resistência ao fluxo observado na circulação sistêmica. (MALENFANT et al., 2013). O ventrículo direito bombeia o mesmo volume sistólico que o ventrículo esquerdo, com um quarto do trabalho cardíaco devido à menor resistência da vasculatura pulmonar. Por isso, a parede do ventrículo direito é fina, medindo 2-5 mm, e normalmente contém um sexto da massa muscular do ventrículo esquerdo. Ainda, a câmara ventricular direita possui uma capacitância elevada e uma maior capacidade de lidar com as alterações na pré-carga do que na pós-carga. Dessa forma, o ventrículo direito pode acomodar altos volumes em pressões fisiológicas, como por exemplo no exercício, mas é menos eficiente ao enfrentar um aumento agudo na resistência vascular pulmonar (BOGAARD et al., 2009).

De acordo com a lei de Laplace, um aumento na pós-carga pode ser compensado por um aumento na espessura da parede do ventrículo (hipertrofia), e isso normaliza o estresse da parede e o consumo de oxigênio pelo miocárdio. Dessa forma, quando cronicamente exposto ao aumento na resistência vascular pulmonar, como acontece na HAP, o ventrículo direito é capaz de se adaptar e remodelar para compensar e manter o débito cardíaco, com hipertrofia do miocárdio (CHEMLA et al., 2002).

Inicialmente, o remodelamento ocorre de forma compensatória, porém existe uma correlação entre a massa do ventrículo direito e área de parede livre, indicando que ocorre tanto hipertrofia como dilatação da câmara (CHEMLA et al., 2002). A fase de hipertrofia adaptativa ou compensada é muito curta, evoluindo rapidamente para dilatação do ventrículo direito e redução da fração de ejeção, levando à insuficiência ventricular direita e morte (MCLAUGHLIN; DAVIS; CORNWELL, 2011).

A hipertrofia adaptativa é caracterizada por uma hipertrofia concêntrica com função sistólica e diastólica preservada e quando descompensada, a hipertrofia é

excêntrica com perda de função (VONK-NOORDEGRAAF et al., 2013). O exato mecanismo que determina a transição de hipertrofia compensada para descompensada ainda é desconhecido. Embora o aumento na pós-carga seja o primeiro gatilho para a hipertrofia do ventrículo direito, a sinalização neuro-humoral, o estresse oxidativo e as respostas inflamatórias parecem desempenhar um papel no remodelamento e acelerar o desenvolvimento da insuficiência cardíaca na HAP. (BOGAARD et al., 2009; HARRISON; HATTON; RYAN, 2015). Outros fatores incluem o tempo de início de hipertensão pulmonar, a sua etiologia subjacente e fatores genéticos (VONK-NOORDEGRAAF et al., 2013).

A sinalização mediada pelas espécies reativas de oxigênio está envolvida tanto no desenvolvimento da hipertrofia compensatória, como na evolução para hipertrofia descompensada. O excesso de EROs altera negativamente a sinalização redox, promovendo o remodelamento de forma mal adaptativa (BROWN; GRIENGLING, 2015).

Em um modelo animal de HAP induzido por monocrotalina, a resposta hipertrófica inicial foi acompanhada por um aumento na reserva antioxidante, sem perda na função hemodinâmica. Na sexta semana após a indução, a hipertrofia evoluiu para dilatação com redução da função sistólica e diastólica no ventrículo direito, juntamente com a diminuição na reserva antioxidante e dano oxidativo à lipídeos. Estas alterações sugerem que estresse oxidativo está relacionado ao remodelamento mal adaptativo e a perda de função no *Cor Pulmonale* (FARAHMAND; HILL; SINGAL, 2004).

Em um trabalho do nosso grupo de pesquisa, Ludke (2010) analisou se as propriedades antioxidantes do suco de uva influenciariam o remodelamento do ventrículo direito no modelo animal de monocrotalina. Nos animais tratados previamente, o suco de uva impediu o aumento na pressão diastólica do ventrículo direito e atenuou o aumento na pressão sistólica e na hipertrofia do ventrículo direito (LUDKE et al., 2010). Neste modelo, no estudo de Mosele (2012), o pré-tratamento com suco de uva promoveu melhora em parâmetros hemodinâmicos e atenuou o aumento na resistência vascular pulmonar, juntamente com a indução da enzima antioxidante tioredoxina-1 e alterações na expressão de proteínas envolvidas no remodelamento do ventrículo direito (MOSELE et al., 2012).

A função do ventrículo direito é um dos principais determinantes da capacidade funcional e do prognóstico na HAP. Curiosamente, dados mostram que

alguns pacientes tratados com os medicamentos disponíveis, tiveram perda de função do ventrículo direito apesar de uma resposta hemodinâmica positiva à terapia (ou seja, apesar de uma diminuição da pressão arterial pulmonar) (VAN DE VEERDONK et al., 2011). Quando a hipertensão pulmonar está associada com o desenvolvimento do *Cor pulmonale*, o prognóstico piora acentuadamente. A insuficiência ventricular direita é uma das principais causas de morte na HAP e a insuficiência cardíaca de origem pulmonar representa 20% de todos os casos de insuficiência cardíaca (LEHRMAN et al., 2002).

O padrão ouro para a realização do diagnóstico da hipertensão pulmonar é o cateterismo cardíaco. Porém, em função do caráter invasivo, não possibilita acompanhar a evolução clínica e eficácia terapêutica. A ecocardiografia é um método não invasivo que permite avaliar as alterações morfológicas e funcionais do ventrículo direito e estimar a pressão na artéria pulmonar (CHEMLA et al., 2002). A avaliação ecocardiográfica do ventrículo esquerdo é rotineira e já estão bem estabelecidos valores normais para suas dimensões, volumes, massa e função. Já as medidas de referência para o tamanho e função normais do ventrículo direito são limitadas, devido a sua forma geométrica complexa. Por isso, muitos médicos realizam uma análise qualitativa para avaliação do tamanho e da função do ventrículo direito (RUDSKI et al., 2010).

Em pacientes com HAP, algumas medidas ecocardiográficas tem se mostrado bons indicadores de prognóstico, tais como as dimensões das câmaras cardíacas direitas, excursão sistólica do plano anular da tricúspide (TAPSE), derrame pericárdico, cálculo do índice de performance miocárdica do ventrículo direito (IPM), velocidade de regurgitação na tricúspide e área do átrio direito (PRISTERA et al., 2016). O IPM, também conhecido como índice de TEI, fornece uma estimativa da função global, tanto sistólica como diastólica do ventrículo direito. Ele é baseado na relação entre o trabalho desenvolvido na ejeção e não-ejeção do coração (RUDSKI et al., 2010). A excursão sistólica no plano anular da tricúspide (TAPSE) é uma medida da função longitudinal do ventrículo direito que além de ser facilmente reprodutível na avaliação ecocardiográfica, mostrou uma forte correlação com a função ventricular direita e o prognóstico na HAP (FORFIA et al., 2006).

Além disso, alterações no padrão de fluxo de sangue pela artéria pulmonar podem ser avaliadas na ecocardiografia através da técnica de Doppler pulsátil. Em pessoas normais, a onda de fluxo da artéria pulmonar tem formato simétrico, o fluxo

acelera e desacelera gradualmente com pico de velocidade máxima na mesossístole. Em situações de elevada resistência vascular pulmonar, como na HAP, as fases de aceleração e pico ocorrem antes da metade da sístole, com um segundo pico também chamado “entalhe” no final da ejeção (ROBERTS; FORFIA, 2011).

1.1.3. Tratamento da Hipertensão Arterial Pulmonar

O tratamento medicamentoso da hipertensão arterial pulmonar avançou substancialmente ao longo dos últimos 20 anos. Atualmente, estão disponíveis cinco classes diferentes de drogas (antagonistas dos receptores de endotelina, inibidores da fosfodiesterase 5, estimuladores da guanilato ciclase solúvel, análogos da prostaciclina, e agonistas do receptor de prostaciclina) (HOEPER et al., 2016).

Os alvos das terapias atuais são 3 vias principais envolvidas na regulação do tônus vasomotor pulmonar (endotelina-1, óxido nítrico e prostaciclina). A disfunção endotelial é resultado da diminuição da produção de mediadores endógenos vasodilatadores (óxido nítrico e prostaciclina) e da regulação positiva dos níveis de endotelina-1. A resultante desta disfunção do endotélio promove vasoconstrição e proliferação de células musculares lisas. A via de endotelina-1 pode ser bloqueada por antagonistas do receptor de endotelina-1 seletivos ou não seletivos. A participação do óxido nítrico pode ser modulada mediante administração exógena de óxido nítrico, inibição da fosfodiesterase tipo 5, ou estimulação da guanilato ciclase solúvel. A ação da prostaciclina pode ser melhorada pela utilização de agonistas do receptor de prostaglandina I₂ (HUMBERT et al., 2014). Além disso, a combinação destes compostos pode oferecer benefícios superiores que a monoterapia, especialmente em pacientes com HAP com insuficiência hemodinâmica grave, para quem o prognóstico ainda é pobre (SITBON et al., 2016).

Embora os agentes farmacológicos atuais permitam a melhora tanto de desfechos clínicos como da qualidade de vida dos doentes, a HAP continua a ser uma doença sem cura. Elucidar novos mecanismos e novas vias de sinalização na fisiopatologia da HAP é fundamental para a identificação de alvos terapêuticos

inovadores, para progredir em direção a uma cura futuramente (HUMBERT et al. 2014).

1.1.4. Modelo Animal de Hipertensão Pulmonar

Modelos experimentais foram criados para estudar e entender os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão da hipertensão arterial pulmonar. Ainda não existe um modelo único que possa reproduzir toda complexidade da HAP, uma vez que nenhum modelo animal reproduz todo o espectro de alterações patológicas observadas nos pulmões de pacientes com hipertensão pulmonar. Apesar disso, os modelos animais são ferramentas científicas valiosas para a compreensão da hipertensão arterial pulmonar e identificação de novas opções terapêuticas (PAK et al., 2010). Os modelos animais mais utilizados são baseados na administração de monocrotalina e na exposição crônica à hipóxia (modelos clássicos). Vantagens do modelo de monocrotalina são a simplicidade técnica, reprodutibilidade e baixo custo em comparação com outros modelos (GOMEZ-ARROYO et al., 2012).

A monocrotalina é um alcaloide pirrolizidínico presente nas sementes da leguminosa *Crotalaria spectabilis*. No fígado, a monocrotalina é ativada por enzimas do citocromo P450, formando o metabólito tóxico dehidromonocrotalina, que leva à lesão vascular. Os resultados da ingestão oral das sementes de *Crotalaria spectabilis* por ratos jovens e o desenvolvimento progressivo de hipertensão pulmonar, associado à hipertrofia do ventrículo direito e ao aumento da espessura da camada média do tronco pulmonar e da camada muscular das artérias pulmonares, foram descritos a mais de 40 anos (KAY; HARRIS; HEATH, 1967).

O modelo de HAP é alcançado por uma injeção subcutânea ou intraperitoneal única de monocrotalina (60-80 mg/kg) resultando em remodelamento vascular na árvore arterial pulmonar 7 dias após a administração, levando à hipertensão pulmonar durante a segunda semana e hipertrofia progressiva do ventrículo direito 12 dias após a injeção, enquanto que a disfunção ventricular direita normalmente se estabelece após 3 a 4 semanas (GOMEZ-ARROYO et al., 2012; GUIHAIRE et al., 2013). Os efeitos vasculares da monocrotalina ocorrem principalmente no pulmão,

sem influenciar os vasos sanguíneos sistêmicos, pois o pulmão é o primeiro leito vascular distal ao fígado (PAK et al., 2010).

O modelo de monocrotalina mimetiza as doenças do grupo 1 da classificação da Hipertensão Pulmonar (PAK et al., 2010). Nos ratos, várias características são semelhantes à HAP humana, incluindo a disfunção endotelial, proliferação de células musculares lisas, a inflamação vascular, remodelamento e insuficiência do ventrículo direito, sendo um modelo largamente utilizado para estudos farmacológicos (NOGUEIRA-FERREIRA et al., 2015; RYAN; MARSBOOM; ARCHER, 2013).

O exato mecanismo pelo qual a monocrotalina induz a hipertensão arterial pulmonar ainda é desconhecido. No entanto, é um modelo considerado confiável e reprodutível de HAP que mimetiza muitos dos componentes celulares e moleculares da doença (RYAN; MARSBOOM; ARCHER, 2013).

1.2. ESTRESSE OXIDATIVO

1.2.1. Espécies Reativas de Oxigênio e Sistemas Antioxidantes

Os radicais livres são espécies químicas capazes de existir de forma independente, que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados, reativos e instáveis, capazes de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, que podem exercer a função de agentes oxidantes, atuando como receptores de elétrons, ou de agentes redutores, atuando como doadores de elétrons (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

A molécula de O_2 é considerada um radical livre, pois a mesma possui dois elétrons desemparelhados, os quais estão em spins paralelos. Nesse sentido, o oxigênio é um potente agente oxidante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). As espécies químicas geradas a partir do oxigênio são denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs) e incluem os radicais livres, tais como o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxil (OH^{\cdot}), e não-radicais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

A mitocôndria é a principal fonte de EROs. Durante a geração de energia na cadeia respiratória mitocondrial, ocorre a redução tetravalente do oxigênio molecular, ou seja, recebimento de quatro elétrons simultaneamente, formando água e liberando energia para a síntese de ATP. Cerca de 5% do oxigênio sofre uma redução monovalente, recebendo apenas um elétron de cada vez, gerando compostos intermediários altamente reativos. O radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é o primeiro intermediário formado pela adição de um elétron. A adição de outro elétron leva à formação do íon peróxido (O_2^{2-}), gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esta reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). Na presença de metais como os íons Fe^{+2} ou Cu^+ , o H_2O_2 pode sofrer uma reação não enzimática chamada reação de Fenton, gerando o radical hidroxil (OH^{\bullet}), uma das EROs mais potentes (BABCOCK, 1999).

Essas moléculas exercem importantes papéis no metabolismo celular. Em baixas ou moderadas concentrações, as EROs agem de maneira benéfica, participando na defesa celular contra agentes infecciosos, na resposta mitogênica e em diversos sistemas de sinalização celular. Porém, o excesso de EROs pode causar dano a lipídeos, proteínas e DNA, alterando suas funções normais. (VALKO et al., 2007).

Para impedir os danos provocados pelo excesso de EROs, a vida aeróbica desenvolveu um conjunto complexo de sistemas antioxidantes para controlar as concentrações dessas substâncias. Essas moléculas podem doar elétrons e ou átomos de hidrogênio a oxidantes, e assim, cessar as reações em cadeia, assegurando a homeostase redox celular. As defesas antioxidantes são constituídas de elementos enzimáticos e não-enzimáticos. O sistema de defesa enzimático é constituído basicamente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). As defesas não enzimáticas são representadas pela glutathione (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), carotenóides e flavonóides (JONES, 2006; HOGG; KALYANAMARAN, 1999).

A primeira linha de defesa antioxidante é dismutação do $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 , catalizada pela enzima SOD, que existe em diferentes compartimentos celulares e com várias isoformas, como a SOD 1 (CuZnSOD) encontrada no citoplasma, espaços entre as membranas mitocondriais, núcleo e lisossomas. A CAT, normalmente localizada nos peroxissomas, catalisa a conversão do H_2O_2 à água e oxigênio. O H_2O_2 não é considerado um radical livre por não possuir elétrons

desemparelhados no orbital mais externo, mas é considerado uma espécie reativa de oxigênio, pois na presença de metais de transição como Fe^+ e Cu^{++} pode dar origem ao radical hidroxil, um dos radicais mais agressivos aos sistemas biológicos. A GPx também catalisa a redução do H_2O_2 por meio da reação de conversão de glutathiona reduzida (GSH) à glutathiona oxidada (GSSG) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Outras enzimas antioxidantes importantes são a tioredoxina (Trx), a glutarredoxina (Grx) e peroxiredoxina (Prx) e tioredoxina redutase (TR) (RHEE et al., 2005).

Além dos antioxidantes enzimáticos clássicos, outras enzimas participam da defesa antioxidante. A enzima heme oxigenase-1 (HO-1) desempenha um papel importante na metabolização do grupo heme, um potente pró-oxidante, à biliverdina (subsequentemente metabolizada à bilirrubina), ferro e monóxido de carbono. Além de prevenir a ação altamente oxidativa do grupo heme, os subprodutos gerados podem exercer efeitos citoprotetores. A bilirrubina possui ação antioxidante e o monóxido de carbono apresenta atividade antiproliferativa e anti-inflamatória (GOZZELINO; JENEY; SOARES, 2010). Existem 3 isoformas da heme oxigenase, sendo a HO-1 induzível no coração e nos vasos sanguíneos, em resposta a vários estresses. Estudos tem mostrado que a HO-1 exerce um importante efeito cardioprotetor (WU; HO; YET, 2011).

Entre as defesas antioxidantes não-enzimáticas, destaca-se o papel da glutathiona na remoção de H_2O_2 e de radicais livres. Composta por aminoácidos que contêm grupos tióis (glutamato, cisteína e glicina), a forma reduzida da glutathiona (GSH) serve como doador de elétrons para a redução de peróxidos catalisada pela enzima GPx, sendo convertida em glutathiona oxidada (GSSG). A GSH é recuperada através da glutathiona redutase (GR), pela transferência de elétrons do NADPH para a GSSG (SIES, 1999; BRIGELIUS-FLOHE, 1999). Além disso, a GSH reage não enzimaticamente com radicais como O_2^- , OH^* e ONOO^- , atuando como um varredor direto de EROs (JONES, 2002).

A expressão de muitas enzimas antioxidantes é regulada por fatores de transcrição redox-sensíveis como o Nrf-2 (*NF-E2-related fator 2*). O Nrf-2 é considerado o regulador central da resposta celular antioxidante, induzindo a transcrição de centenas de genes com ação citoprotetora, incluindo enzimas de fase II e antioxidantes como a HO-1, NADPH quinona oxiredutase, glutathiona s-transferase (GST) e catalase (PALL; LEVINE, 2015). Os potenciais benefícios à

saúde de diversos fitoquímicos como cúrcuma e resveratrol tem sido relacionados ao Nrf-2 (HYBERTSON et al., 2011). Neste contexto, o sulforafano, encontrado em vegetais como o brócolis, tem se mostrado um indutor muito potente da ativação do Nrf-2 (HOUGHTON; FASSETT; COOMBES, 2016).

As espécies reativas, juntamente com mecanismos de defesas antioxidantes, agem na sinalização redox interferindo em diversas funções celulares. Desta forma, o estresse oxidativo é definido como o rompimento da sinalização e controle redox, pelo aumento significativo da concentração intracelular de espécies oxidantes, acompanhadas simultaneamente pela perda das defesas antioxidantes, levando a um potencial dano à célula (JONES, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SIES, 1991).

1.2.2. Estresse Oxidativo e Hipertensão Arterial Pulmonar

Atualmente, cerca de 200 doenças humanas estão associadas com o estresse oxidativo (HYBERTSON et al., 2011). A HAP está associada a um estado generalizado de maior estresse oxidativo (DEMARCO et al., 2010). O aumento da produção de EROs na HAP está diretamente ligado ao remodelamento vascular pulmonar, a disfunção endotelial, as respostas vasoconstritoras alteradas, a inflamação e as modificações da matriz extracelular, todas características importantes na fisiopatologia da doença (FREUND-MICHEL et al., 2013).

Em um modelo animal de indução de HAP por hipóxia crônica ou monocrotalina, animais que não expressavam a enzima SOD apresentaram níveis hipertróficos e pressóricos maiores do que os animais selvagens, indicando um papel importante desta enzima na proteção do pulmão para o desenvolvimento da HAP (XU et al., 2011). Em um modelo de indução de HAP por derivação sistêmica-pulmonar crônica, a falência do ventrículo direito foi associada à regulação negativa da HO-1 e a ativação de processos inflamatórios locais (BELHAJ et al., 2013). Em humanos, pulmões de indivíduos com HAP apresentam atividade reduzida das enzimas antioxidantes SOD e GPx (MASRI et al., 2008).

Por outro lado, estudos apontam o efeito benéfico dos agentes antioxidantes em modelos animais de HAP. No modelo de monocrotalina, o tratamento com o antioxidante sintético EUK-134 atenuou a hipertrofia ventricular, melhorou a função

sistólica, reduziu a sinalização pró-apoptótica no coração e impediu a fibrose intersticial (REDOUT et al., 2010).

Como já descrito, EROs estão envolvidas na fisiopatologia da HAP, tanto no remodelamento vascular pulmonar, como na perda de função do ventrículo direito. Isto indica que as EROs podem ser alvos terapêuticos interessantes na HAP. O bloqueio das vias de sinalização dependentes de EROs, ou interrupção das fontes de EROs na vasculatura pulmonar representam estratégias terapêuticas promissoras nesta doença (FREUND-MICHEL et al., 2013).

1.3. SULFORAFANO

Fatores dietéticos desempenham um papel essencial no tratamento ou prevenção de várias doenças, incluindo as doenças cardiovasculares. Neste sentido, o grupo dos vegetais crucíferos parece ser particularmente benéfico. Um estudo investigou o efeito do consumo de vegetais e frutas sobre a mortalidade total e cardiovascular em mais de 100 mil chineses, que participaram de dois estudos de coortes prospectivas com uma média de seguimento de 10,2 e 4,6 anos. No geral, o consumo de frutas, legumes e verduras foi inversamente associado com o risco de mortalidade total, com um efeito de dose-resposta particularmente para a ingestão de vegetais crucíferos. Essa associação inversa foi mais forte para a mortalidade por doenças cardiovasculares do que para a mortalidade total (ZHANG, X et al., 2011).

Ainda, evidências epidemiológicas tem mostrado que a ingestão de vegetais crucíferos exerce efeito protetor contra alguns tipos de câncer, principalmente câncer gástrico e de pulmão (KIM; PARK, 2009). A atividade biológica de compostos extraídos de vegetais crucíferos vem sendo estudada de forma promissora em diversas doenças como o câncer, diabetes, aterosclerose, doenças neurodegenerativas e autismo (CONZATTI et al., 2015; VAZQUEZ-PRIETO; MIATELLO, 2010; YANG et al., 2016). A maioria dos estudos se dedica à análise de glicosinolatos e isotiocianatos relacionados, especialmente o sulforafano (SFN) (ARES; NOZAL; BERNAL, 2013).

Existem cerca de 300 gêneros e 3000 espécies de vegetais crucíferos distribuídos pelo mundo todo, principalmente em regiões temperadas. Destes, o

gênero *Brassica* (famílias *Brassicaceae* e *Cruciferae*), inclui um número importante de vegetais, destacando-se o brócolis, repolho, couve-flor e a couve (BUCK, 1956). Os vegetais crucíferos são uma boa fonte compostos fitoquímicos potencialmente protetores, especialmente os glicosinolatos (LATTÉ; APPEL; LAMPEN, 2011). Os glicosinolatos são tioglicosídeos que contêm um grupamento ciano e um grupamento sulfato, compreendendo um grupo de cerca de 120 compostos que podem ser encontrados em pelo menos 16 famílias de vegetais (FAHEY; ZALCMANN; TALALAY, 2001).

Nas plantas, a função dos glicosinolatos está relacionada com a defesa contra insetos e fitopatógenos. Quando os tecidos das plantas são lesados por insetos ou processados pelo corte, cozimento e pela própria mastigação, os glicosinolatos são expostos à ação da enzima mirosinase, presente no próprio vegetal, que os hidrolisa a isotiocianatos, gerando compostos com atividade biológica (BONES; ROSSITER, 2006). Além disso, a flora intestinal humana também tem capacidade de converter glicosinolatos em isotiocianatos (FAHEY et al., 2012).

A glicorafanina é o glicosinolato mais abundante no brócolis, correspondendo a 90% do conteúdo de glicosinolato em algumas espécies (CIESLIK et al., 2007; KUSHAD et al., 1999). No entanto, a melhor fonte dietética de glicorafanina são brotos de brócolis jovens, de 3 dias de idade, que podem conter quantidades 10-100 vezes maiores que os vegetais maduros (FAHEY; ZHANG; TALALAY, 1997).

Os potenciais benefícios dos vegetais crucíferos são atribuídos ao isotiocianado sulforafano (PÉREZ et al., 2014). Quando a glicorafanina é hidrolisada pela enzima mirosinase, provoca a liberação de glicose e de um intermediário instável que se reorganiza para formar o sulforafano e/ou sulforafano nitrilo (figura 1). Uma vez formado, o sulforafano está disponível para absorção no intestino humano e é então metabolizado pela via do ácido mercaptúrico (WATSON et al., 2013).

Os produtos formados na hidrólise da glicorafanina variam conforme as condições da reação, como o pH, temperatura, a presença ou ausência de proteínas complementares, tais como proteínas *epithiospecifier* (ESP) e presença de Fe^{2+} . Em condições de pH neutro, o produto predominante é sulforafano. Já na presença da proteína *epithiospecifier* e Fe^{2+} , são formadas grandes quantidades de sulforafano nitrilo, que não possui atividade biológica (BONES; ROSSITER, 2006).

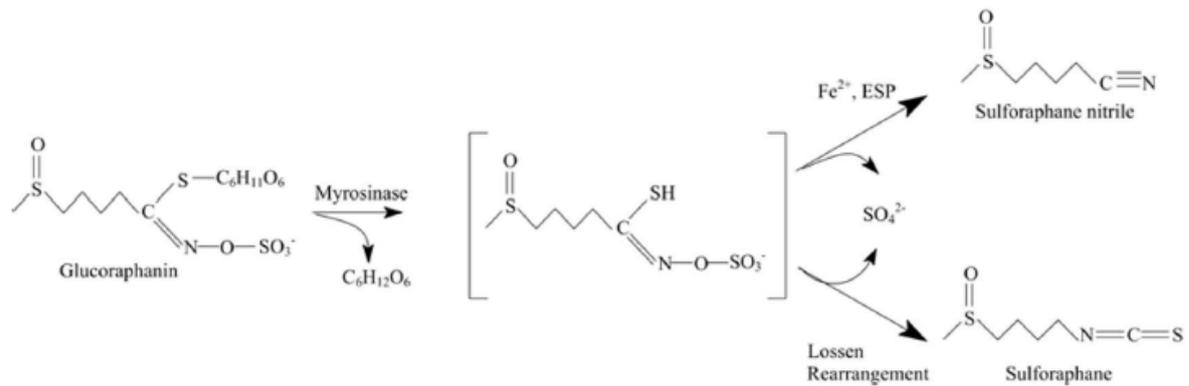


Figura 1 – Representação esquemática da hidrólise da glicorafanina mediada pela enzima mirosinase. Adaptado de MATUSHESKI; JUVIK; JEFFERY, 2004.

O principal determinante para a atividade da mirosinase e formação de sulforafano é processamento térmico dos vegetais. Quando aquecidos a uma temperatura acima de 70 °C, a mirosinase da planta é completamente inativada, de forma que o sulforafano não é mais formado. Como a proteína *epithiospecifier* é mais sensível ao calor do que a mirosinase, o breve aquecimento/cozimento pode ser uma maneira prática para inativá-la, mantendo a atividade da enzima, e assim, otimizando a formação de sulforafano (GU; GUO; GU, 2012; MATUSHESKI; JUVIK; JEFFERY, 2004).

Considerar o impacto do processamento dos alimentos na formação de sulforafano é importante, uma vez que o brócolis é consumido principalmente processado (cortado, branqueado, cozido). Em um estudo realizado por Pérez (2014) a condição ideal de processamento do brócolis maduro correspondeu à imersão em água a 57 °C, durante 13 minutos. Nesta condição, foram observados o teor mínimo de glicorafanina e atividade máxima da mirosinase. O teor de sulforafano alcançado foi de 3,98 $\mu\text{mol/g}$ de massa seca, que representa um aumento de 237% no teor de sulforafano em comparação com o vegetal fresco (PÉREZ et al., 2014).

1.3.1. Atividade Biológica do Sulforafano

Estudos mostram que o sulforafano atua como um antioxidante indireto, por meio da indução do fator de transcrição Nrf2 (*NF-E2-related factor*) (KENSLER et al., 2013; GLADE; MEGUID, 2015). O Nrf2 é um fator de transcrição central na regulação do estado redox celular, que controla a expressão de uma sequência de genes citoprotetores. No citoplasma o Nrf2 se encontra ligado à proteína Keap1, que provoca a ubiquitinação e posterior degradação do Nrf2. Em resposta à estímulos como a oxidação, essa ligação é quebrada e ocorre a translocação nuclear do Nrf2. O sulforafano pode interagir com a proteína Keap1, rompendo a interação Nrf2-Keap1, permitindo a ativação e translocação nuclear do Nrf2. No núcleo, o Nrf2 se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE), região promotora de genes que codificam enzimas antioxidantes tais como CAT, SOD, GPx e enzimas de fase II e síntese de GSH (VOMHOF-DEKREY; PICKLO, 2012; FIGUEIREDO et al., 2015).

A transcrição aumentada de genes-alvo do Nrf2 provoca uma forte resposta citoprotetora, aumentando a resistência à carcinogênese e doenças que tenham o estresse oxidativo envolvido na patogênese, como por exemplo, a HAP (KENSLER et al., 2013). Além disso, em comparação com outros fitoquímicos amplamente utilizados como o resveratrol, o sulforafano é um ativador do Nrf2 mais potente. (HOUGHTON; FASSETT; COOMBES, 2016).

Dessa forma, a utilização do sulforafano como antioxidante indireto vem sendo estudada. Em cultura de células, incubação de cardiomiócitos com de sulforano foi capaz de aumentar significativamente diversas enzimas antioxidantes (glutathiona redutase (GR); glutathiona-S-transferase (GST); tioredoxina redutase (TR) e NADPH quinona oxirredutase (NQO1)). Além disso, o tratamento de células cardíacas com sulforafano antes da exposição ao H₂O₂ protegeu contra o dano oxidativo induzido por peróxido (ANGELONI et al., 2009).

Resultados do nosso grupo de pesquisa foram semelhantes. Em cardiomioblastos, a incubação com sulforafano provocou um aumento na atividade das enzimas SOD, CAT e GST, aumentou expressão da enzima HO-1, reduziu os níveis de espécies de reativas de oxigênio e peroxidação lipídica. O sulforafano também diminuiu a sinalização de apoptose, aumentando a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2, diminuindo a razão Bax/Bcl-2 (FERNANDES et al., 2015).

Em ratos, a administração intraperitoneal de sulforafano protegeu o coração em um modelo de isquemia-reperfusão, através da preservação de enzimas antioxidantes (Mn-superóxido dismutase (Mn-SOD), CAT e HO-1) (PIAO et al., 2010). Neste mesmo modelo, utilizando um pré-tratamento com sulforafano (10 mg/kg), durante 3 dias, um trabalho do nosso grupo de pesquisa não observou alterações na função mecânica, apesar do aumento nas enzimas SOD e HO-1 e redução nos níveis de espécies reativas de oxigênio (BONETTO et al., 2015).

Um estudo de escalonamento de dose controlado por placebo investigou os efeitos do sulforafano sobre a expressão de enzimas de fase II (glutathione-S-transferase M1 (GSTM1), glutathione-S-transferase P1 (GSTP1), NADPH quinona oxidoreductase (NQO1) e HO-1 nas vias aéreas superiores de 57 indivíduos saudáveis. Cada indivíduo consumiu uma porção/dia de brotos de brócolis homogeneizados contendo 0,283 $\mu\text{mol/ml}$ durante 3 dias em doses que variaram de 25 a 200 g. Todos os indivíduos toleraram o tratamento sem efeitos adversos significativos. Os resultados em células de lavado nasal mostraram um aumento dose-dependente na expressão das enzimas GSTM1, GSTP1, NQO1 e HO-1, com indução enzimática máxima na dose de 200 g de brotos de brócolis (aumento de 119%, 101%, 199% e 121% em comparação com os valores basais, respectivamente) (RIEDL; SAXON; DIAZ-SANCHEZ, 2009). Este estudo demonstra que a dose necessária para aumentar a atividade de enzimas antioxidantes em vias respiratórias humanas é alcançável através da dieta.

Estudos em humanos e em modelos animais tem mostrado o potencial do sulforafano na proteção contra uma série de doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão, aterosclerose, lesão por isquemia/reperfusão e cardiomiopatia diabética (BAI et al., 2015). No entanto, o estudo de isotiocianatos na doença cardiovascular ainda é pouco explorado e o papel do sulforafano na hipertensão arterial pulmonar, especialmente no remodelamento do ventrículo direito é desconhecido.

2. HIPÓTESE

O estresse oxidativo está associado à hipertensão arterial pulmonar (HAP). Neste contexto, a administração de sulforafano promove redução das espécies reativas por melhorar as defesas antioxidantes, e, dessa forma, atenua o remodelamento do ventrículo direito induzido pela HAP.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos do sulforafano sobre o remodelamento e estresse oxidativo no ventrículo direito de ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito do tratamento com sulforafano em ratos com Hipertensão Arterial Pulmonar:

- ✓ No ganho de massa corporal dos animais.
- ✓ Nos parâmetros relacionados à função cardíaca através de ecocardiografia e registro de pressão ventricular direito.
- ✓ No grau de hipertrofia ventricular direita através de parâmetros morfométricos.
- ✓ Na congestão hepática e congestão pulmonar através de parâmetros morfométricos.
- ✓ Nos parâmetros de estresse oxidativo cardíaco (concentração de H_2O_2 , atividade das enzimas SOD, CAT e GPx, na relação GSH/GSSG e lipoperoxidação).
- ✓ No imunoconteúdo da proteína HO-1.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Foram utilizados 44 ratos machos Wistar pesando aproximadamente 250 gramas. O tamanho da amostra foi calculado *a priori*, utilizando o programa *Sigma Plot 11.0*. No cálculo do tamanho da amostra foram considerados probabilidade de erro $\alpha = 0.05$ e poder do teste estatístico ($1 - \beta$ probabilidade de erro) = 0.95. Os animais provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em caixas plásticas com medidas 15 x 32 x 39 cm, com assoalho coberto com serragem, sendo quatro animais por caixa. Todos os animais foram mantidos sob condição padrão de biotério: ambiente com temperatura controlada (21°C), ciclo “claro-escuro” de 12 horas e umidade relativa do ar de 70%. Água e ração comercial foram oferecidas “*ad libitum*”. O ganho de peso foi aferido no início do protocolo, aos 7 dias e após, a cada dois dias.

4.2. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com a Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA 2013 e conforme a Lei Nº. 11.794, de 08 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal do Brasil, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob o número 26270.

4.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em grupos da seguinte maneira:

1 – Grupo Controle (C) (n=10) – Animais que receberam apenas o veículo da Monocrotalina e do Sulforafano.

2 – Grupo Controle com Sulforafano (CS) (n=10) – Animais que receberam o veículo da Monocrotalina e o tratamento com Sulforafano.

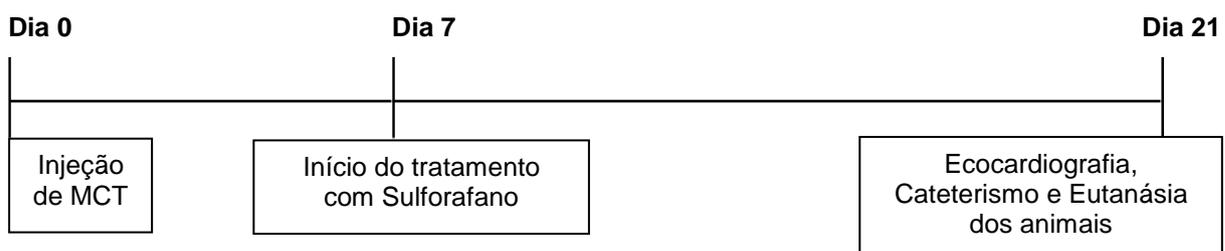
3 – Grupo Monocrotalina (M) (n=12) - Animais que receberam a Monocrotalina e apenas o veículo do Sulforafano.

4 – Grupo Monocrotalina com Sulforafano (MS) (n=12) – Animais que receberam a Monocrotalina e o tratamento com Sulforafano.

4.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos. A hipertensão arterial pulmonar foi induzida por injeção intraperitoneal (i.p.) de monocrotalina no grupo M e MS. Os grupos C e CS receberam injeção composta com solução salina. Após 7 dias e do estabelecimento da HAP, o tratamento com o Sulforafano foi iniciado nos grupos CS e MS, e com solução salina nos grupos C e M. Após 21 dias de protocolo, foi realizado a ecocardiografia e cateterismo nos animais para avaliação de função cardíaca; logo após, foi realizado o procedimento de eutanásia dos animais. O cronograma experimental é ilustrado na figura 2.

Figura 2 – Cronograma experimental



4.5. INDUÇÃO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

Para a indução de hipertensão arterial pulmonar, os ratos dos grupos M e MS receberam dose única intraperitoneal de 60 mg/kg de monocrotalina (Crotaline – C240 SIGMA) (SINGAL et al., 2000). Os ratos dos grupos C e CS receberam dose única de solução salina (i.p.).

4.6. ADMINISTRAÇÃO DO SULFORAFANO

Os animais dos grupos CS e MS receberam injeções via intraperitoneal de sulforafano (2,5 mg/kg/dia) (R,S–Sulforaphane LKT laboratories) diluído em veículo (solução salina (NaCl 0,9%) contendo 0,5% de DMSO). As injeções foram administradas a partir do dia 7 até o dia 20 (14 doses). Esta dose foi definida considerando a grande variação de protocolos de tratamento disponíveis na literatura e os resultados encontrados em trabalhos anteriores do nosso laboratório. A escolha de iniciar o tratamento no sétimo dia após a injeção de monocrotalina levou em conta o fato de que neste tempo a droga já foi metabolizada e excretada (HUXTABLE, 1990) e que os animais já apresentam aumento na pressão sistólica do ventrículo direito (FARAHMAND; HILL; SINGAL, 2004).

Os animais dos grupos C e MCT receberam o veículo (solução salina (NaCl 0,9%) contendo 0,5% de DMSO) para receberem o mesmo estresse.

4.7. EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Aos 21 dias de protocolo, após a realização da análise ecocardiográfica e do cateterismo, com os animais ainda anestesiados, o procedimento de eutanásia foi efetuado por guilhotinamento (decapitação).

O coração foi rapidamente retirado da cavidade torácica, lavado 3 vezes em solução de KCl 1,15%, separado o ventrículo direito do ventrículo esquerdo e septo,

pesados em uma balança digital. Após a pesagem, o ventrículo direito foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C para posteriores análises. Foram coletados e pesados fígado e pulmão. A tíbia foi retirada e medida com um paquímetro para cálculo da estimativa de hipertrofia cardíaca.

4.8. AVALIAÇÃO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR ATRAVÉS DE PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS

4.8.1. Massa Corporal

A massa corporal dos animais permite estimar de forma indireta a progressão da HAP, uma vez que o emagrecimento é uma característica desta doença no modelo induzido por monocrotalina (FARAHMAND; HILL; SINGAL, 2004). Neste estudo a massa corporal dos animais foi verificada no início do experimento, no dia 3, no dia 7 quando iniciou o tratamento e a cada dois dias através de balança manual da marca Marte.

4.8.2. Estimativa de Hipertrofia do Ventrículo Direito

O índice de hipertrofia cardíaca fornece dados quanto ao aumento de massa do coração. Esse dado é calculado pela razão da massa em gramas do tecido cardíaco (VD ou VE) pelo comprimento da tíbia multiplicado por cem (expresso em porcentagem) (HU et al., 2003).

4.8.3. Estimativa de Congestão Hepática e Pulmonar

Imediatamente após a eutanásia dos animais, o fígado e o pulmão foram retirados e pesados. Subsequentemente, foram acondicionados em estufa a 65°C e pesados diariamente até que apresentassem valor constante de massa. Este procedimento é conhecido como peso úmido/ peso seco e foi utilizado para estimar a congestão hepática e pulmonar (FARAHMAND; HILL; SINGAL, 2004).

4.9. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA POR ECOCARDIOGRAFIA

A análise ecocardiográfica foi realizada sob anestesia com quetamina (90 mg/kg i.p.) e xilazina (10 mg/kg i.p.). As imagens foram obtidas através do modo bidimensional, modo M e do Doppler pulsado (Sistema de Ultrassom Philips HD7, Andover, MA, USA), utilizando um transdutor piezoelétrico setorial S12-4 (Philips, Andover, MA, USA). Foram avaliados os seguintes parâmetros relacionados ao ventrículo direito: o volume sistólico (VS), o débito cardíaco (DC), a relação entre o tempo de aceleração (TAc) do fluxo pela artéria pulmonar pelo tempo de ejeção (TEj) do fluxo de sangue pela artéria pulmonar, a relação entre a velocidade máxima do enchimento rápido e lento (Pico E/Pico A), a excursão sistólica do plano do anel da tricúspide (TAPSE), a área na sístole e na diástole, o % do diâmetro do ventrículo direito correspondente ao diâmetro do ventrículo esquerdo, a Variação Fracional da Área (FAC), a Fração de Encurtamento (FEC) e o Índice de Performance do Miocárdio (IPM). (RUDSKI et al., 2010; URBONIENE et al., 2010).

Para o cálculo do volume sistólico foi usada a seguinte fórmula: $VS = \text{área de secção transversal da artéria pulmonar (AST)} \times \text{integral tempo-velocidade do fluxo pela artéria pulmonar (VTI)}$; onde: $AST = (\text{diâmetro sistólico da artéria pulmonar}/2)^2 \times 3,14$. Para o cálculo do débito cardíaco, foi usada a seguinte fórmula: $DC = VS \times \text{frequência cardíaca (FC)}$, onde: $FC = 60/\text{intervalo RR medido durante o fluxo pela artéria pulmonar}$.

Para o cálculo da Variação Fracional da Área foi utilizado $FAC = (\text{área diastólica final do VD} - \text{área sistólica final do VD}/\text{área diastólica final do VD}) \times 100$.

Para o cálculo da Fração de Encurtamento do VD foi utilizado $FEC = (\text{diâmetro diastólico final do VD} - \text{diâmetro sistólico final do VD} / \text{diâmetro diastólico final do VD}) \times 100$.

Para o cálculo do Índice de esforço do Miocárdio utilizou-se $IPM = (\text{tempo de fechamento da valva tricúspide} - \text{tempo de ejeção pela artéria pulmonar}) / \text{tempo de ejeção pela artéria pulmonar}$ (RUDSKI et al., 2010; URBONIENE et al., 2010).

4.10. AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA POR REGISTRO DE PRESSÃO VENTRICULAR DIREITA

Após a análise ecocardiográfica, com os animais ainda anestesiados, a veia jugular direita foi exposta e um cateter de polietileno (PE-50) preenchido com solução salina (NaCl 0,9%) foi introduzido até o átrio e ventrículo direito. O cateter foi conectado a um transdutor de pressão (Strain Gauge - Narco Biosystem Pulse Miniature Transducer RP-155, Houston, TX, USA) acoplado a um amplificador de sinais (Pressure Amplifier HP 8850C), para monitoração da pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD) e pressão diastólica final do ventrículo direito (PDFVD). Os sinais analógicos da pressão foram digitalizados (Windaq – Data Acquisition System, PC 486) com taxa de amostragem de 1000 Hz (LUDKE et al., 2010). Com base nestes resultados, foi calculada a pressão média da artéria pulmonar ($PMAP = 0,61 \times PSVD + 2$). Sabe-se que a PSVD é semelhante à pressão sistólica na artéria pulmonar, justificando a sua utilização neste cálculo (KOSKENVUO et al., 2010). Para estimar a Resistência Vascular Pulmonar (RVP) utilizou-se a fórmula $RVP = (PMAP - PDFVD) / DC$ (URBONIENE, 2010).

4.10.1. Análise da Derivada de Contração e Relaxamento do Ventrículo Direito

A análise foi realizada utilizando um programa comercial (Windaq) associado ao sistema de aquisição. Esse programa permite a derivação da onda de pressão ventricular direita e detecção de pontos máximos e mínimos a cada ciclo cardíaco, fornecendo valores positivos da derivada de contração ($+dP/dt$ – Índice de Contratilidade) e negativos da derivada de relaxamento ($-dP/dt$ – Índice de Relaxamento). Os resultados foram expressos em mmHg/s.

4.11. ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

4.11.1. Preparo do Homogeneizado

Para as análises de estresse oxidativo, parte do ventrículo direito foi descongelado e homogeneizado durante 40 segundos em ultra-turrax, na presença de KCl 1,15% (5 ml/g de coração) e de fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100 mM em isopropanol (10 μ L por mL de KCl adicionado). O PMSF é um inibidor de proteases e é utilizado para evitar a degradação das enzimas cuja atividade será medida. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 1000 x g em centrífuga refrigerada a 4°C (Sorvall RC 5 B – Rotor SM 24) e o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a -80° C. (LLESUY et. al., 1985).

4.11.2. Quantificação de Proteínas

As proteínas do tecido cardíaco foram quantificadas pelo método descrito por Lowry (1951), que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL em água destilada. As medidas foram efetuadas em um

espectrofotômetro a 625nm e os resultados expressos em mg/mL (LOWRY et al., 1951).

4.11.3. Concentração de Peróxido de Hidrogênio

A concentração de peróxido de hidrogênio foi determinada de acordo com o método descrito por Pick & Keisari (1980). A técnica está baseada na oxidação do vermelho de fenol pelo peróxido de hidrogênio mediado pela peroxidase de rabanete, resultando na produção de um composto que pode ser analisado espectrofotometricamente a 610 nm. O resultados foram expressos em nmoles de H₂O₂ por mg de proteína (Método de Lowry) (PICK & KEISARI, 1980; LOWRY et al, 1951).

4.11.4. Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A enzima antioxidante SOD catalisa a dismutação do ânion radical superóxido em H₂O₂. A técnica utilizada para determinação da SOD foi baseada na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O radical 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. Portanto, quanto maior for a concentração de SOD na amostra, menor será a auto-oxidação do pirogalol. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 420 nm. A atividade da SOD foi determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado (MARKUNLD, 1985). Os resultados foram expressos em U SOD/mg proteína.

4.11.5. Atividade da Enzima Catalase (CAT)

A CAT é uma hemoproteína que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio à água. A atividade da catalase é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio e obedece a uma cinética de pseudoprimeira ordem. Sendo assim, sua atividade pode ser medida através da avaliação do consumo do H₂O₂. Este teste consiste em medir a diminuição da absorbância no comprimento de onda de 240nm, que é onde ocorre maior absorção pelo peróxido de hidrogênio. Para a realização deste ensaio foram utilizados uma solução tampão fosfato a 50mM (pH=7,4) e peróxido de hidrogênio 0,3M. Os resultados foram expressos em picomoles por miligramas de proteína (AEBI, 1984).

4.11.6. Atividade da Enzima Glutationa Peroxidase (GPx)

A enzima GPx catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutathiona reduzida (GSH), formando glutathiona oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido. A GPx atua acoplada à glutathiona redutase (GR), a qual catalisa a redução da GSSG à GSH, utilizando NADPH. Desta forma a atividade da GPx é determinada medindo o consumo de NADPH na presença de GSH e GR. Assim, a atividade da GPx foi medida em espectrofotômetro, observando a diminuição de absorbância do NADPH a 340 nm. Foi também adicionada azida sódica para inibir a atividade da catalase. A amostra foi previamente preparada adicionando uma mistura de cianetos para inibir a atividade pseudo-peroxidativa da hemoglobina. Os resultados foram expressos em nmoles por minuto/mg de proteína (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984).

4.11.7. Determinação da Glutathiona Reduzida (GSH) e Oxidada (GSSG)

A razão entre a concentração de GSH e GSSG foi determinada no homogeneizado de ventrículo direito. Para determinar a glutathiona total, o homogeneizado do tecido precisou ser desproteínezado 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 100mmol/L (pH 7,2), ácido nicotinamida dinucleotídeo fosfato (NADPH) 2 mmol/L, glutathiona redutase 0,2 U/mL, ácido ditionitrobenzóico 70 µmol/L. Na determinação da glutathiona reduzida, o sobrenadante neutralizado reagiu com ácido ditionitrobenzóico 70 µmol/L e foi lido no espectrofotômetro a 420nm (AKERBOON; SIES, 1981).

4.11.8. Lipoperoxidação Avaliada por Quimiluminescência (QL)

A avaliação da lipoperoxidação por quimiluminescência foi baseada no método que consiste na adição de um hidroperóxido orgânico de origem sintética (hidroperóxido de tert-butil) ao homogeneizado de tecido, para avaliação da capacidade de resposta produzida pela amostra. No homogeneizado de ventrículo direito foi adicionado tampão fosfato 20 mmol/L, 140 mmol/L KCl, pH 7,4 e hidroperóxido de tert-butil 400 mmol/L. 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. Este método é um dos métodos mais sensíveis para a medida de lipoperoxidação. A quimiluminescência foi medida em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Bromma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. As determinações foram realizadas em sala escura, com frascos de vidro mantidos na penumbra, a fim de evitar a ativação da fosforescência pela luz fluorescente. Foi medida a emissão de luz e, desta, foi descontada a emissão basal (emissão de luz do tampão mais a amostra) para fins de cálculos. Os resultados foram expressos em

contagens por segundo (cps) por miligrama de proteína (GONZALEZ FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991).

4.11.9. Análise da Expressão Proteica por *western blot*

Para o isolamento das proteínas, as amostras de tecido foram descongeladas em tampão Tris-EDTA gelado (Tris HCl 100mM, EDTA 5mM, pH=7,4) e homogeneizadas com a utilização do homogeneizador Politron em dois pulsos de 15 segundos com intervalos de 10 segundos. Foram adicionados ao tampão aprotinina (10·g/ml) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (20µM), para prevenir degeneração proteica. As concentrações de proteína foram analisadas através do método de Bradford e foram utilizadas para normalizar a quantidade de proteína carregada nos géis (BRADFORD, 1976).

Foram expostas 40µg de proteína a eletroforese de gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando 15% (P/V) de gel separados e 5% (P/V) de gel fixador. As proteínas separadas foram transferidas através de eletroforese para membrana usando tampão Towbin modificado, contendo Tris 20mM, glicina 150mM, metanol 20% (V/V), SDS 0,02% (P/V) (pH=8,3) em uma cuba de transferência resfriada. Após, os sítios de proteínas inespecíficas foram bloqueados através de 1 hora de incubação com solução bloqueadora (5% (P/V) de leite desnatado) em tampão Tris salina 0,1% (P/V), tween-20. As membranas foram processadas por imunodeteção usando o anticorpo primário hemeoxigenase 1 (M-300) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, US).

O anticorpo primário foi detectado usando o anticorpo secundário “goat anti-rabbit horseradish peroxidase” e as membranas foram reveladas por quimiluminescência. Os filmes autorradiográficos foram quantitativamente analisados no densitômetro de imagem (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences, Europe, IT). Os pesos moleculares das bandas de proteínas foram determinados em referência a um marcador de peso molecular (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). O resultado de cada membrana foi normalizado pelo método de Ponceau (KLEIN et al., 1995).

4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*. Os resultados mostraram distribuição normal e estão apresentados como média \pm desvio padrão. Os valores de cada animal foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias e complementados pelo teste de *Student-Newman-Keuls*. O software utilizado para a realização da análise foi o *SigmaPlot*, versão 11.0. Foi considerada uma probabilidade de erro alfa menor ou igual que 0,05 ($P \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. AVALIAÇÃO DA HAP ATRAVÉS DE PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS

5.1.1. Massa Corporal e Ganho de Peso dos Animais

A massa corporal dos animais foi verificada no momento de indução da HAP (dia 0), no dia 3, no início do tratamento com o SFN (dia 7), acompanhada a cada dois dias para ajuste da dose de tratamento e ao final do protocolo (dia 21). A figura 3 mostra a média de massa corporal dos grupos experimentais em gramas durante o protocolo.

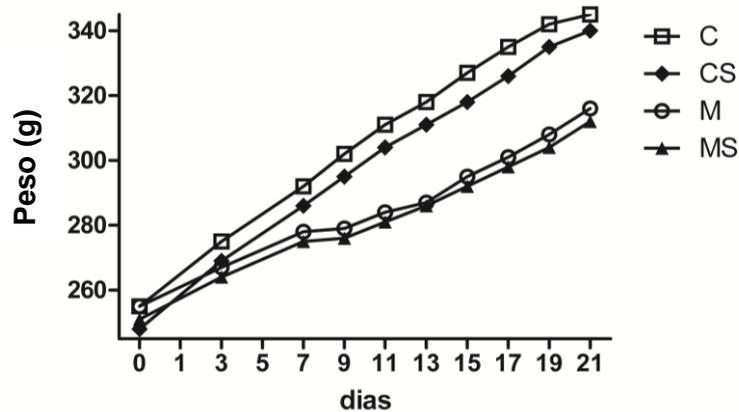


Figura 3. Massa corporal dos animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Os pontos representam as médias de cada grupo. (n=10-11).

No dia 7, quando o tratamento com SFN foi iniciado, os animais que receberam a monocrotalina (M e MS) já apresentavam menor ganho de peso em comparação aos animais controle (C e CS), conforme a figura 4, não havendo diferença entre os grupos M e MS.

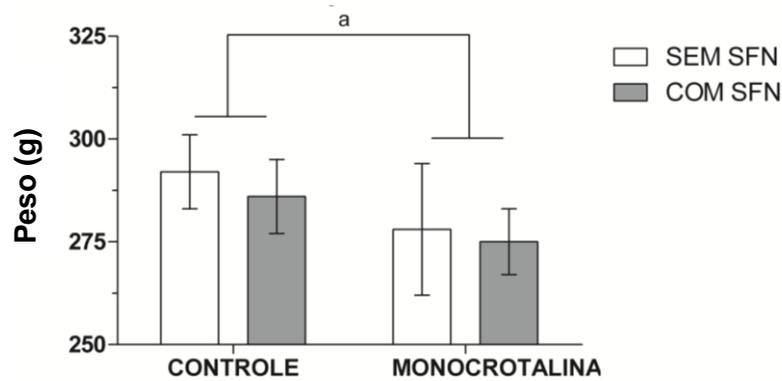


Figura 4. Massa corporal dos animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano no dia 7. Valores expressos como média \pm desvio padrão, (n=10-11), ^a P<0,05 C e CS versus M e MS.

A massa corporal ao final do protocolo mostrou-se alterada entre os animais que receberam monocrotalina e os animais controle. Os grupos M e MS tiveram uma redução no ganho de massa corporal, demonstrado pela redução na massa corporal final quando comparados aos grupos C e CS. O aumento de massa corporal no grupo C foi de 35% e de 37% no grupo CS, quando analisamos a massa corporal no dia 0 e no dia 21. Já nos grupos M e MS, esse aumento foi de 23% e 24% respectivamente, quando analisadas a massa corporal no dia 0 e no dia 21. A figura 5 ilustra a massa corporal final dos grupos.

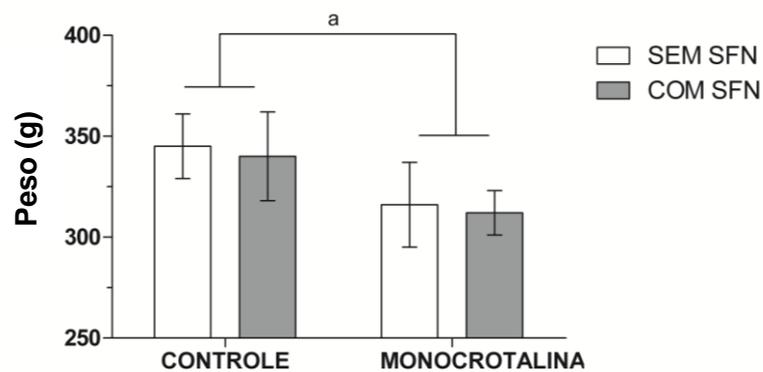


Figura 5. Massa corporal dos animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano no dia 21. Valores expressos como média \pm desvio padrão, (n=10-11), ^a P<0,05 C e CS versus M e MS.

5.1.2. Estimativa de Hipertrofia do Ventrículo Direito

O índice de hipertrofia cardíaca (IHC) foi calculado pela razão da massa do ventrículo direito em mg pelo comprimento da tíbia em mm. Os animais que receberam a monocrotalina (M e MS) tiveram um aumento de 16% neste índice em relação aos animais controle (C e CS). Os grupos MS e CS, assim como MS e M, não diferiram entre si significativamente. Apenas o grupo M diferiu do grupo C, estando aumentado em 23%.

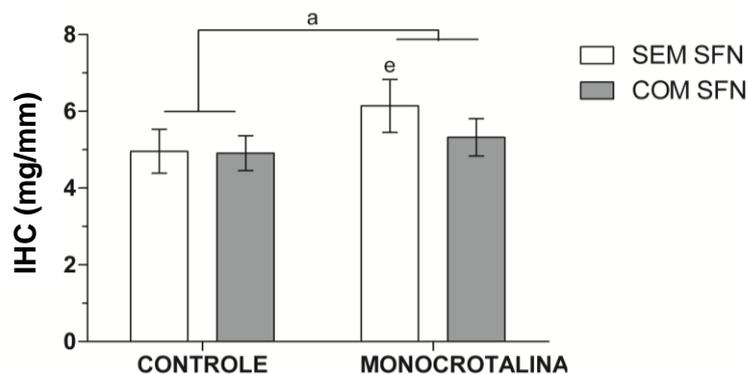


Figura 6. Índice de hipertrofia (IHC) do Ventrículo direito de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm desvio padrão, (n=8-11), ^a P<0,05 C e CS versus M e MS; ^e P<0,05 M versus C.

5.1.3. Estimativa de Congestão Pulmonar e Hepática

A Tabela 1 apresenta os resultados das estimativas de congestão hepática e pulmonar (n=10-11). A estimativa de congestão pulmonar foi obtida através do cálculo da razão entre o peso do pulmão logo após a morte do animal (peso úmido) e a menor massa obtida após pesagens consecutivas do pulmão seco em estufa (peso seco). A congestão pulmonar pode ser considerada um fator associado ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca direita. Neste estudo, não foram encontradas diferenças entre os grupos neste parâmetro.

A estimativa de congestão hepática foi calculada através da razão entre o peso úmido e o peso seco do fígado. Da mesma forma, não foram observadas diferenças entre os grupos.

Tabela 1: Avaliação da congestão pulmonar e hepática em animais controle e com monocrotalina, tratados ou não com sulforafano

Parâmetros	C	CS	M	MS
Congestão Pulmonar	4,56 ± 0,38	4,56 ± 0,26	4,95 ± 0,25	4,93 ± 0,29
Congestão Hepática	3,32 ± 0,04	3,35 ± 0,07	3,36 ± 0,04	3,31 ± 0,08

Valores expressos como média ± DP (n=10-11). C= controle, CS= controle com sulforafano, M= monocrotalina, MS = monocrotalina com sulforafano

5.2. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA ATRAVÉS DE ECOCARDIOGRAFIA

5.2.1. Volume Sistólico e Débito Cardíaco

A Tabela 2 apresenta os resultados do Volume Sistólico e Débito Cardíaco (n=8-11). Não foram observadas diferenças entre os grupos em ambos os parâmetros.

Tabela 2: Avaliação do volume sistólico e débito cardíaco em animais controle e com monocrotalina, tratados ou não com sulforafano

Parâmetros	C	CS	M	MS
Volume Sistólico (mL)	0,34 ± 0,08	0,32 ± 0,04	0,31 ± 0,06	0,34 ± 0,07
Débito Cardíaco (mL/min)	82,53 ± 19,02	76,07 ± 9,82	73,52 ± 18,11	78,57 ± 18,76

Valores expressos como média ± DP (n=8-11). C= controle, CS= controle com sulforafano, M= monocrotalina, MS = monocrotalina com sulforafano.

5.2.2. Fluxo de Sangue na Artéria Pulmonar

A figura 7 ilustra a onda de Fluxo de Sangue na Artéria Pulmonar. Nos animais controle (Figura 7A e 7B) o fluxo na artéria pulmonar tem o formato simétrico, com o pico na metade da sístole. Nos animais que receberam a monocrotalina (Figura 7C e 7D), o padrão da onda é alterado: o pico de velocidade se torna mais agudo e passa a ocorrer precocemente, como consequência do aumento da resistência vascular pulmonar, podendo ser um indicativo de HAP moderada.

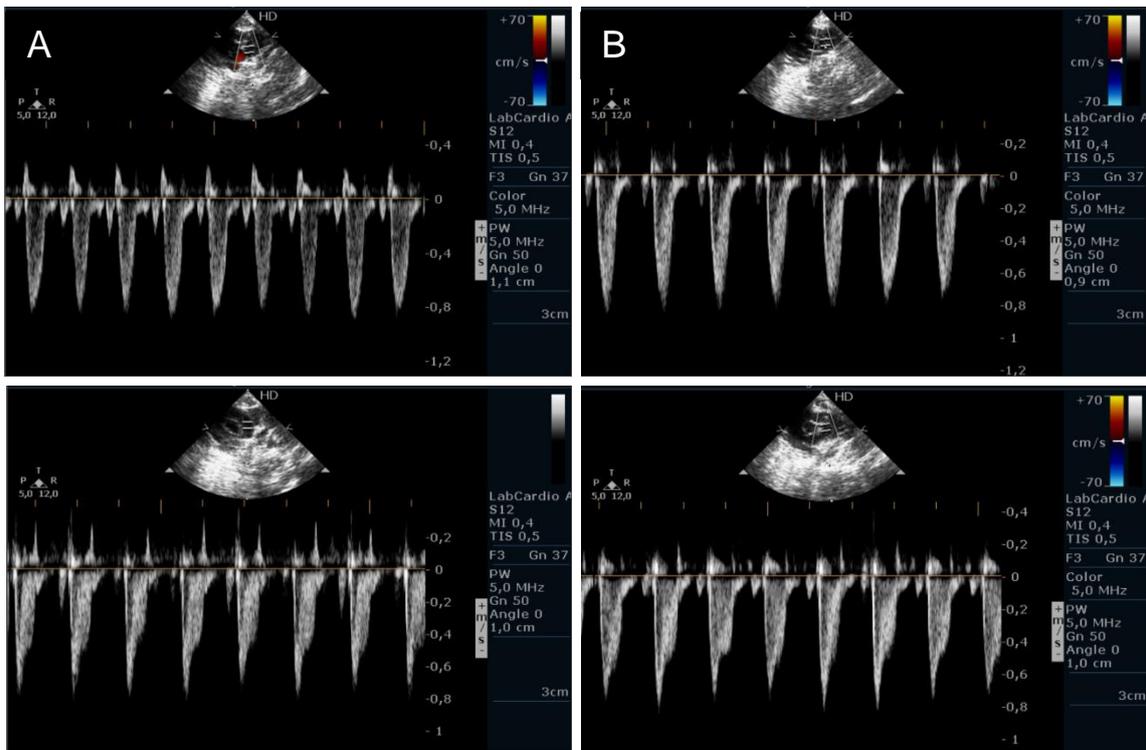


Figura 7: Figura ilustrativa de ecocardiografia Doppler contínuo do fluxo na artéria pulmonar de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. A = grupo C; B = grupo CS; C = grupo M; D = grupo MS.

5.2.3. Resistência Vascular Pulmonar (TAc/TEj)

A razão entre o tempo de aceleração (TAc) pelo tempo de ejeção (TEj) do fluxo pela artéria pulmonar é uma forma não invasiva de determinar aumento na resistência vascular pulmonar (JONES et al., 2002). Os animais que receberam a monocrotalina (M e MS) apresentaram diminuição de 16% na razão TAc/TEj quando comparados aos animais controle (C e CS), indicando um aumento da resistência vascular pulmonar em ambos os grupos. Ainda, razão TAc/TEj foi 16% maior no grupo MS comparado ao grupo M; no entanto, esta diferença não foi significativa. Apenas o grupo M foi diferente do seu grupo controle (C), apresentando uma razão TAc/TEj 22% inferior ao C.

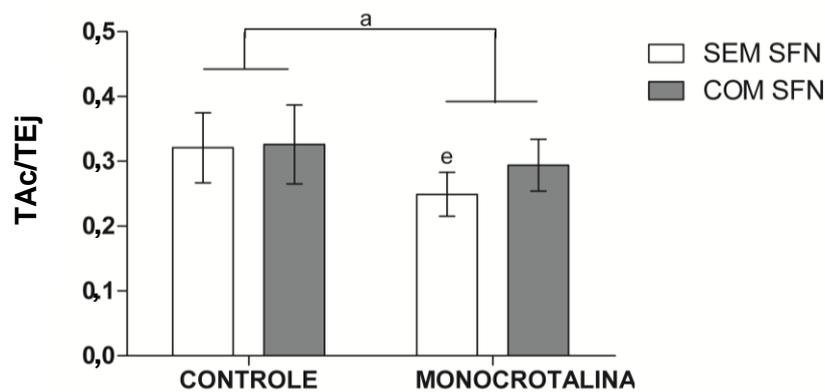


Figura 8. Razão entre o tempo de aceleração (TAc) pelo tempo de ejeção (TEj) do fluxo pela artéria pulmonar de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm desvio padrão, (n=8-11), ^a P<0,05 C e CS versus M e MS; ^e P<0,05 M versus C.

5.2.4. Pico E/Pico A

A razão entre a velocidade máxima de enchimento rápido e lento pela valva tricúspide pode indicar disfunções diastólicas no ventrículo direito. Neste estudo, os animais dos grupos M e MS apresentaram redução de 30% em comparação aos animais C e CS. A redução na razão E/A no grupo M em relação ao grupo C foi de 34%. No grupo MS essa redução foi de 28% comparado ao grupo CS.

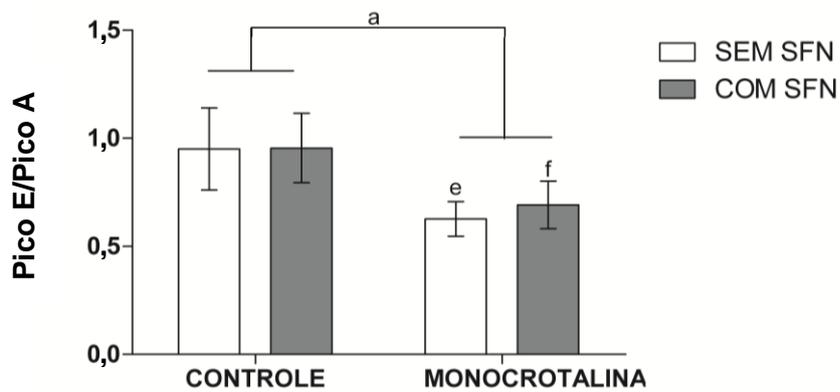


Figura 9. Razão entre as velocidades máximas do enchimento rápido (Pico E) e lento (Pico A) do ventrículo direito de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm desvio padrão, (n=8-11), ^a P<0,05 C e CS versus M e MS; ^e P<0,05 M versus C; ^f P<0,05 MS versus CS.

5.2.5. TAPSE

O TAPSE (excursão sistólica do plano anular da tricúspide) é uma medida da função longitudinal do ventrículo direito (Figura 11). Nos animais que receberam monocrotalina (M e MS), o TAPSE esteve diminuído em 25% comparado aos grupos controle (C e CS). Em relação ao seu controle (C), o TAPSE no grupo M diminuiu 33%, já no grupo MS essa diminuição foi de 16% em relação ao grupo CS. Quando comparados os grupos M e MS, o grupo M apresentou resultados 17% menores.

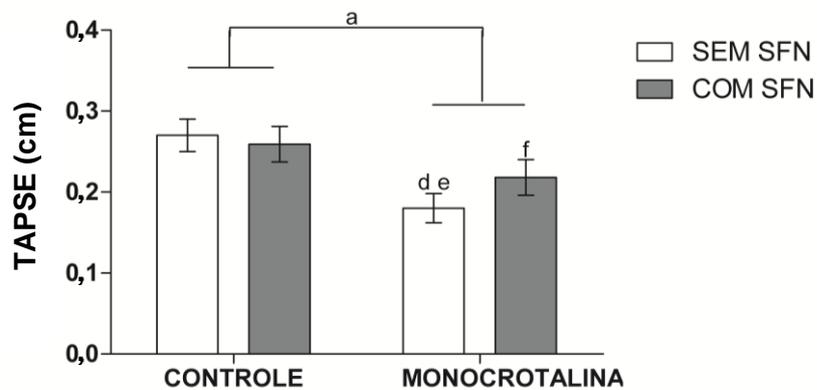


Figura 10. TAPSE (Excursão sistólica do plano anular da tricúspide) de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm desvio padrão, (n=8-11), ^a P<0,05 C e CS versus M e MS; ^d P<0,05 M versus MS; ^e P<0,05 M versus C; ^f P<0,05 MS versus CS.

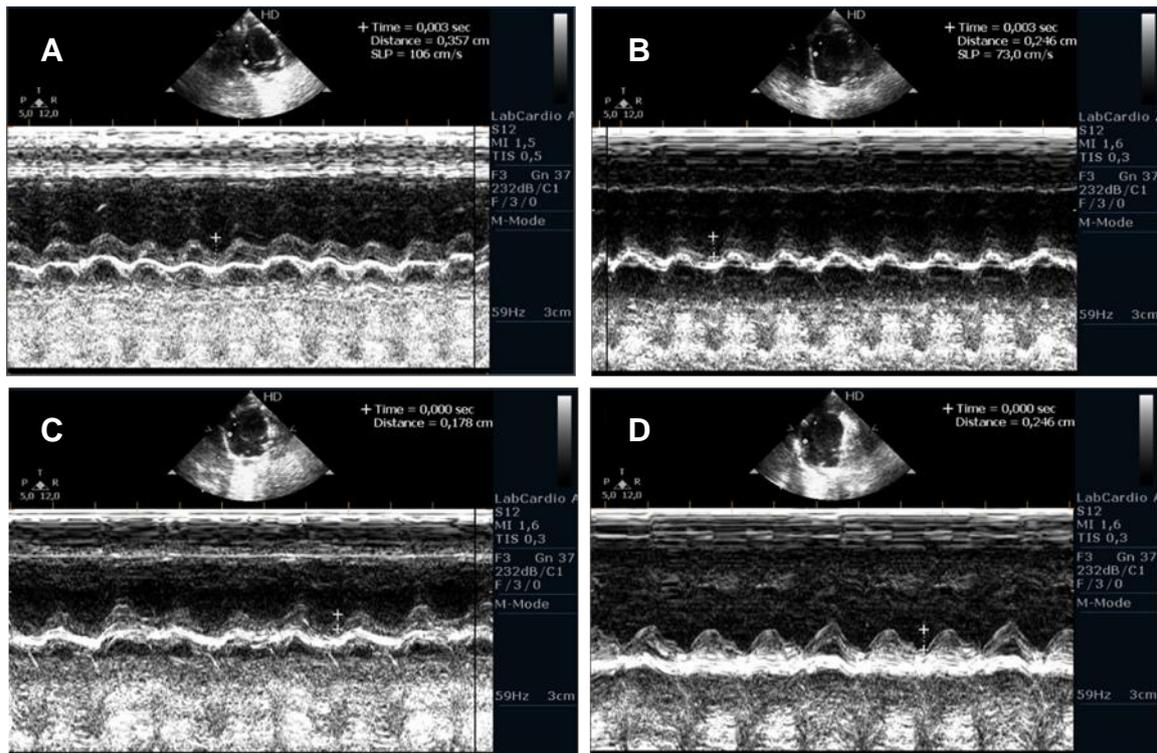


Figura 11: Figura ilustrativa do TAPSE (Excursão Sistólica do Plano do Anel da Tricúspide) obtido por ecocardiografia Modo M em animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. A = grupo C; B = grupo CS; C = grupo M; D = grupo MS.

5.2.6. Área do Ventrículo Direito na Sístole

Os animais que receberam a monocrotalina (M e MS) apresentaram uma área 37% maior do ventrículo direito na sístole comparados aos animais controle. Todavia, apenas no grupo M esse aumento de 60% em relação ao C foi significativo.

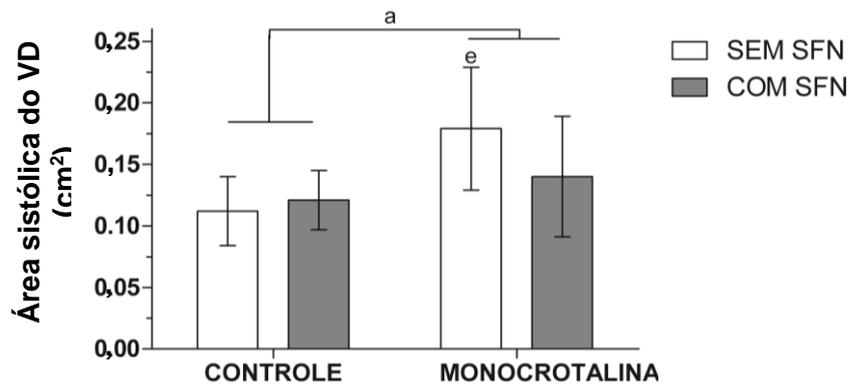


Figura 12. Área do Ventrículo Direito na sístole em animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm desvio padrão, (n=8-11), ^a P<0,05 C e CS versus M e MS; ^e P<0,05 M versus C.

5.2.7. Área do Ventrículo Direito na Diástole

A medida da área do ventrículo direito no final da diástole não apresentou diferença entre os grupos.

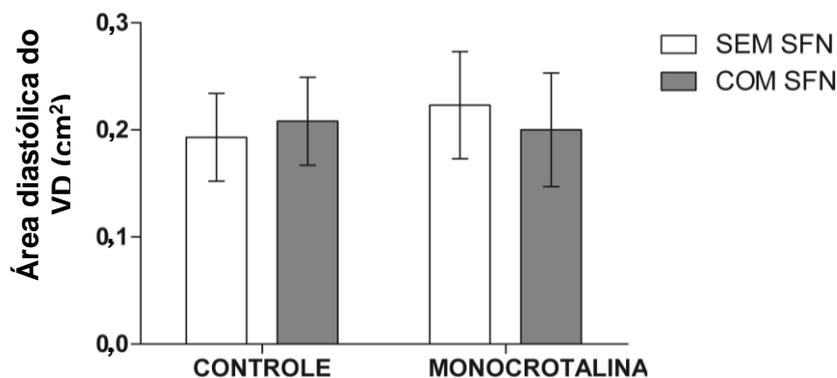


Figura 13. Área do VD na diástole de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm desvio padrão, (n=8-11).

5.2.8. Percentagem do Diâmetro do Ventrículo Direito em relação ao Ventrículo Esquerdo

O ventrículo direito dos animais que receberam a monocrotalina (M e MS) correspondeu a um maior percentual do diâmetro do ventrículo esquerdo comparados aos animais controle. O grupo M foi 19% maior que o grupo C e o grupo MS 16% maior em relação ao CS.

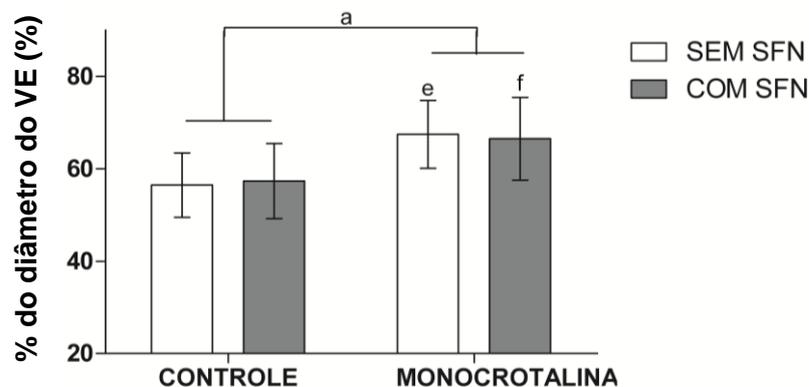


Figura 14. Percentagem do diâmetro do Ventrículo Esquerdo de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm desvio padrão, (n=8-11), ^a P<0,05 C e CS versus M e MS; ^e P<0,05 M versus C; ^f P<0,05 MS versus CS.

5.2.9. Fração de encurtamento do VD (FEC)

A fração de encurtamento do VD foi calculada pela diferença entre o diâmetro no final da diástole e da sístole, dividido pelo diâmetro diastólico final, multiplicado por cem. Nos animais que receberam a monocrotalina (M e MS) a FEC diminuiu 45% quando comparados aos animais controle. O grupo M foi 56% menor que grupo C. A diferença entre o grupo MS e o grupo CS foi de 33%, no entanto, não foi significativa.

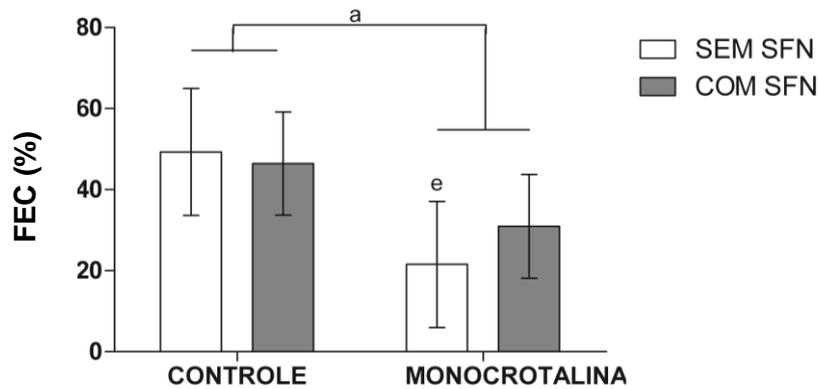


Figura 15. Fração de encurtamento do Ventrículo Direito (FEC) de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm desvio padrão, (n=8-11), ^a P<0,05 C e CS versus M e MS; ^e P<0,05 M versus C.

5.2.10. Variação Fracional da Área do Ventrículo Direito (FAC)

A variação fracional da área (FAC) fornece uma medida da função sistólica do VD. Os grupos M e MS apresentaram valores 32% menores em relação aos grupos controle. O grupo M apresentou resultado 35% inferior ao grupo C, e o grupo MS 29% menor em relação ao grupo CS.

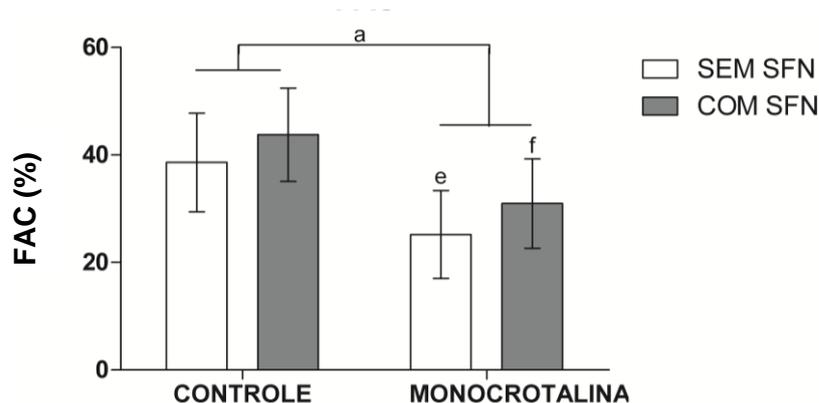


Figura 16. Variação fracional da área do Ventrículo Direito (FAC) (%) de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm desvio padrão, (n=8-11), ^a P<0,05 C e CS versus M e MS; ^e P<0,05 M versus C; ^f P<0,05 MS versus CS.

5.2.11. Índice de Performance do Miocárdio (IPM)

Não houve diferença no Índice de esforço do miocárdio calculado pela diferença entre o tempo de fechamento da valva tricúspide e tempo de ejeção pela artéria pulmonar, dividido pelo tempo de ejeção pela artéria pulmonar.

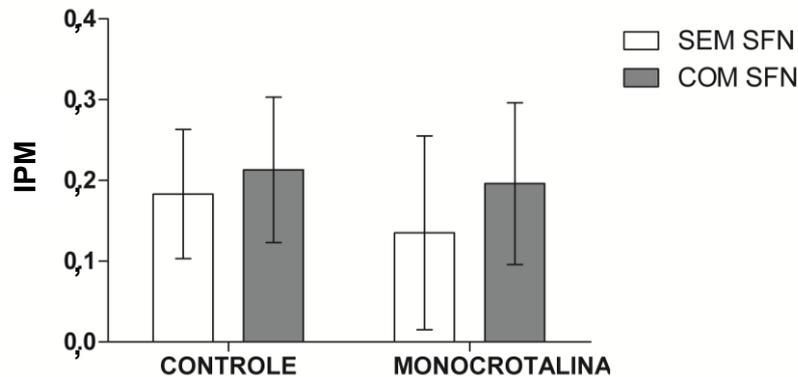


Figura 17. Índice de Performance do Miocárdio (IPM) de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm desvio padrão, (n=7-10).

5.3. AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA POR REGISTRO DE PRESSÃO VENTRICULAR DIREITA

5.3.1. Pressão Sistólica do Ventrículo direito (PSVD)

Na pressão sistólica do ventrículo direito verificada através do cateterismo, foi observado um aumento significativo nos animais que receberam monocrotalina. Os animais dos grupos M e MS tiveram valores de pressão sistólica 60% maiores em relação aos grupos C e CS. O grupo M apresentou um aumento de 72% em relação ao grupo C. Já o aumento no grupo MS em relação ao grupo CS foi de 47%. Além disso, a PSVD no grupo MS foi 19% menor em relação ao grupo que não recebeu o tratamento (M). Ao comparar os animais que receberam o tratamento com sulforafano (CS e MS) com os animais que não receberam (C e M), observou-se uma pressão sistólica 14% menor nos animais que receberam o tratamento.

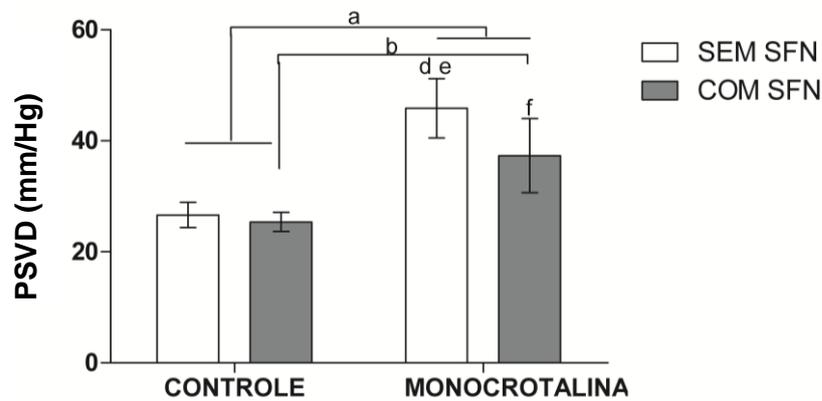


Figura 18. Pressão Sistólica do Ventrículo Direito (PSVD) de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm DP (n=7-10). ^a P<0,05 C e CS versus M e MS; ^b P<0,05 C e M versus CS e MS; ^d P<0,05 M versus MS; ^e P<0,05 M versus C; ^f P<0,05 MS versus CS.

5.3.2. Pressão Diastólica Final do Ventrículo direito (PDFVD)

Em relação à pressão diastólica final do ventrículo direito as diferenças foram observadas apenas entre os animais que receberam a monocrotalina em comparação aos animais controle. Nos animais dos grupos M e MS a PDFVD aumentou em 28% em relação aos grupos C e CS. Apenas o grupo M teve um aumento significativo em relação ao grupo C (35%). Não houve diferenças significativas entre os grupos MS e CS, bem como entre os grupos M e MS.

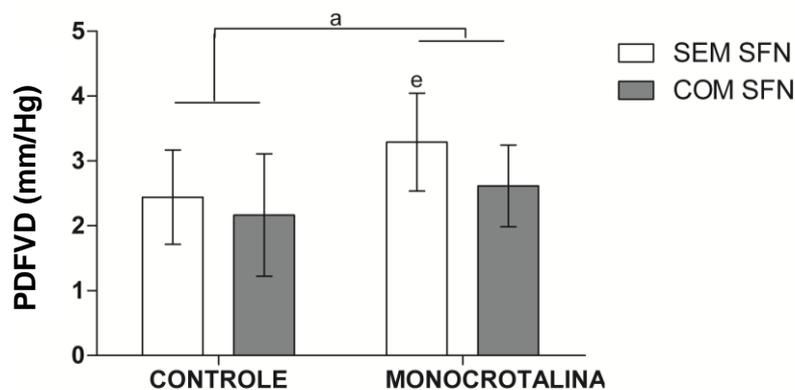


Figura 19. Pressão Diastólica Final do Ventrículo Direito (PDFVD) de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm DP (n=7-10). ^a P<0,05 C e CS versus M e MS; ^e P<0,05 M versus C.

5.3.3. Pressão Média da Artéria Pulmonar (PMAP)

A pressão média na artéria pulmonar foi calculada através da fórmula $PMAP = 0,61 * PSVD + 2$, conforme descrito na metodologia. A PMAP foi 53% maior nos animais M e MS em comparação aos grupos controle. Nos animais que receberam o sulforafano a PMAP foi 12% menor em relação aos grupos C e M. O grupo M apresentou uma PMAP 64% maior em relação ao C. O grupo MS apresentou um aumento de 42% em relação ao seu controle (CS) e uma redução de 17% quando comparado ao grupo M.

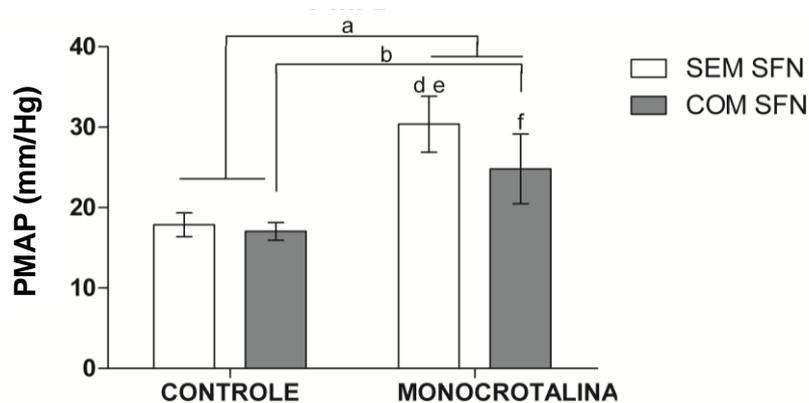


Figura 20. Pressão Média na Artéria Pulmonar (PMAP) de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm DP (n=7-10). ^a P<0,05 C e CS versus M e MS; ^b P<0,05 C e M versus CS e MS; ^d P<0,05 M versus MS; ^e P<0,05 M versus C; ^f P<0,05 MS versus CS.

5.3.4. Resistência Vascular Pulmonar (RVP)

O cálculo da RVP foi realizado utilizando a PMAP, a PDFVD obtida através do cateterismo do VD e o DC calculado a partir da ecocardiografia. Neste parâmetro foi observado um aumento significativo nos animais que receberam monocrotalina. Os animais dos grupos M e MS tiveram um aumento na RVP de 71% em relação aos grupos C e CS. O grupo M teve uma RVP 88% maior em relação ao grupo C. O aumento no grupo MS em relação ao grupo CS foi de 52%. Além disso, a RVP foi 27% menor no grupo MS em relação ao grupo que não recebeu o tratamento (M). Os animais que receberam o tratamento com sulforafano (CS e MS) apresentaram redução da RVP de 21% quando comparados àqueles que não receberam (C e M).

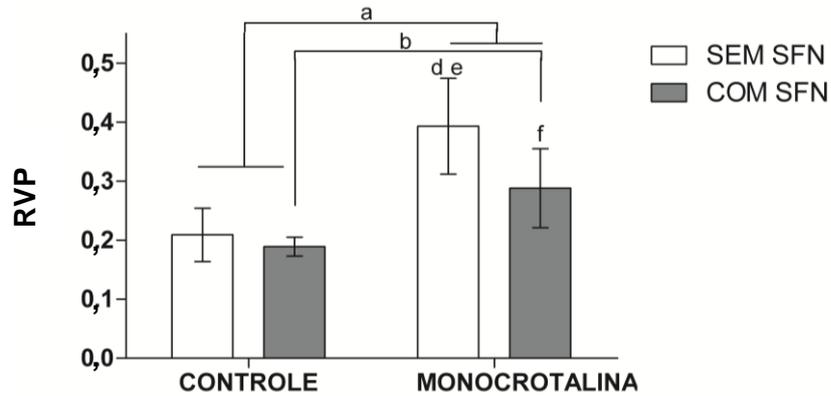


Figura 21. Resistência Vascular Pulmonar (RVP) de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm DP (n=7-10). ^a P<0,05 C e CS versus M e MS; ^b P<0,05 C e M versus CS e MS; ^d P<0,05 M versus MS; ^e P<0,05 M versus C; ^f P<0,05 MS versus CS.

5.3.5. Índice de contratilidade (+dP/dt)

A análise da derivada de contração (+dP/dt) apresentou um aumento significativo nos animais que receberam monocrotalina. Os animais dos grupos M e MS tiveram um aumento de 36% em relação aos grupos C e CS. O grupo M apresentou um aumento de 38% em relação ao grupo C. O aumento no grupo MS em relação ao grupo CS foi de 34%.

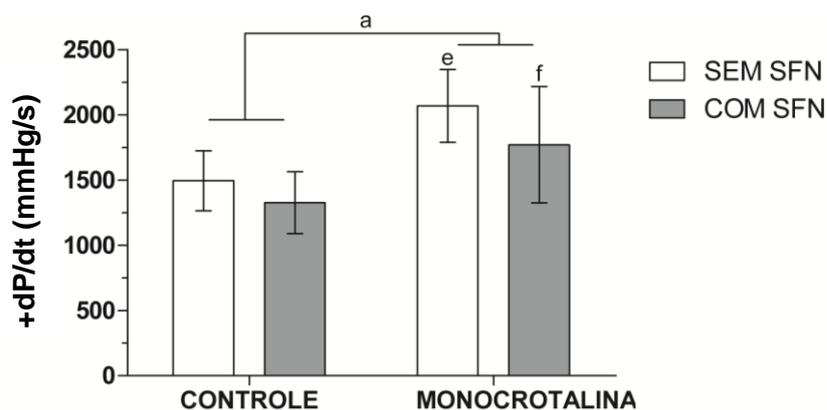


Figura 22. Índice de Contratilidade (+dP/dt) de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm DP (n=7-10). ^a P<0,05 C e CS versus M e MS; ^e P<0,05 M versus C; ^f P<0,05 MS versus CS.

5.3.6. Índice de Relaxamento (-dP/dt)

A análise da derivada de relaxamento (-dP/dt) apresentou um padrão semelhante à derivada de contração (+dP/dt). Os animais dos grupos M e MS tiveram um aumento na -dP/dt de 38% em relação aos grupos C e CS. O grupo M apresentou um aumento de 40% em relação ao grupo C. O aumento no grupo MS em relação ao grupo CS foi de 36%.

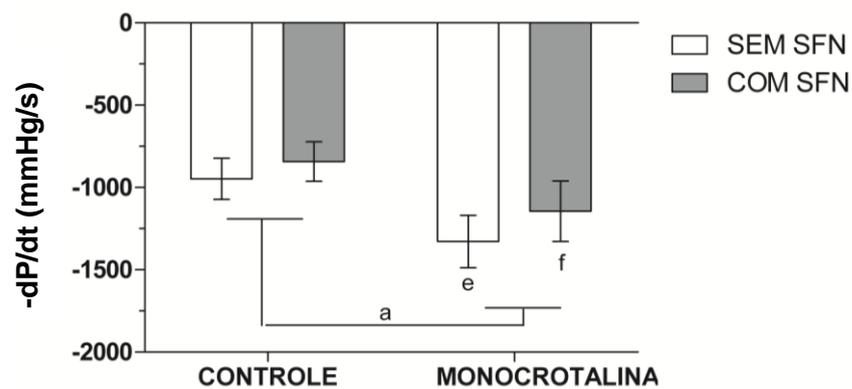


Figura 23. Índice de Relaxamento (-dP/dt) de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm DP (n=7-10). ^a P<0,05 C e CS versus M e MS; ^e P<0,05 M versus C; ^f P<0,05 MS versus CS.

5.4. ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

5.4.1. Concentração de Peróxido de hidrogênio

A concentração de peróxido de hidrogênio no ventrículo direito aumentou nos animais que receberam monocrotalina. Os animais dos grupos M e MS tiveram um aumento de 20% em relação aos grupos C e CS. Ademais, a concentração de H₂O₂ foi 12% menor no grupo MS em relação ao grupo M. Ao comparar os animais que receberam o tratamento com sulforafano (CS e MS) com os animais que não receberam (C e M), observou-se também redução de 12%.

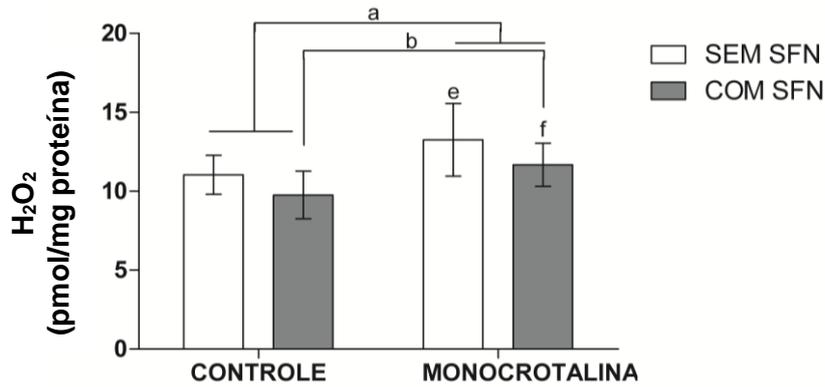


Figura 24. Concentração de Peróxido de Hidrogênio no tecido ventricular direito de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm DP (n=6-8). ^a P<0,05 C e CS versus M e MS; ^b P<0,05 C e M versus CS e MS; ^e P<0,05 M versus C; ^f P<0,05 MS versus CS.

5.4.2. Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD não apresentou variação significativa entre os diferentes grupos neste estudo.

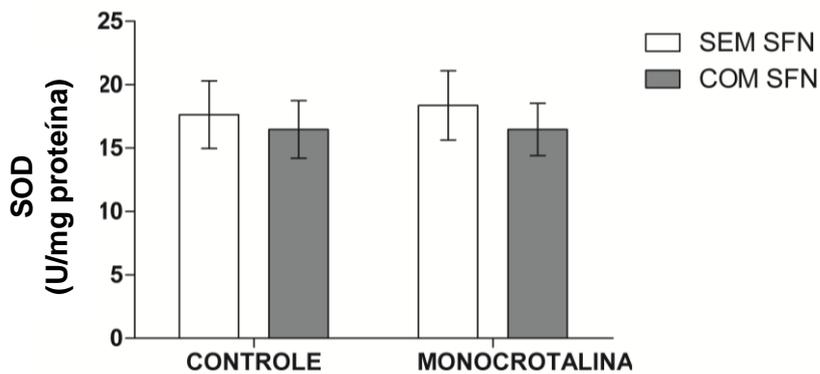


Figura 25. Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) no tecido ventricular direito de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm DP (n=8-11).

5.4.3. Atividade da enzima Catalase (CAT)

A atividade da CAT apresentou diminuição de 20% nos animais doentes (M e MS) em relação aos controles (C e CS). No entanto, apenas o grupo M apresentou variação significativa com relação ao seu controle (C), reduzindo em 31% a atividade da CAT.

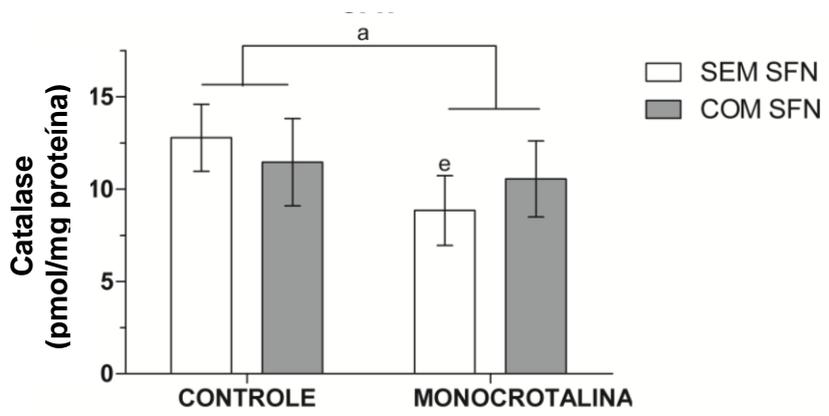


Figura 26. Atividade da enzima Catalase (CAT) no tecido ventricular direito de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm DP (n=9-10). ^a P<0,05 C e CS versus M e MS; ^e P<0,05 M versus C.

5.4.4. Atividade da Enzima Glutathiona Peroxidase (GPx)

A determinação da atividade da enzima GPx revelou uma diminuição de 25% nos animais que receberam sulforafano comparados aos animais controle (C e M). A atividade da enzima foi 59% no grupo M comparado ao grupo MS.

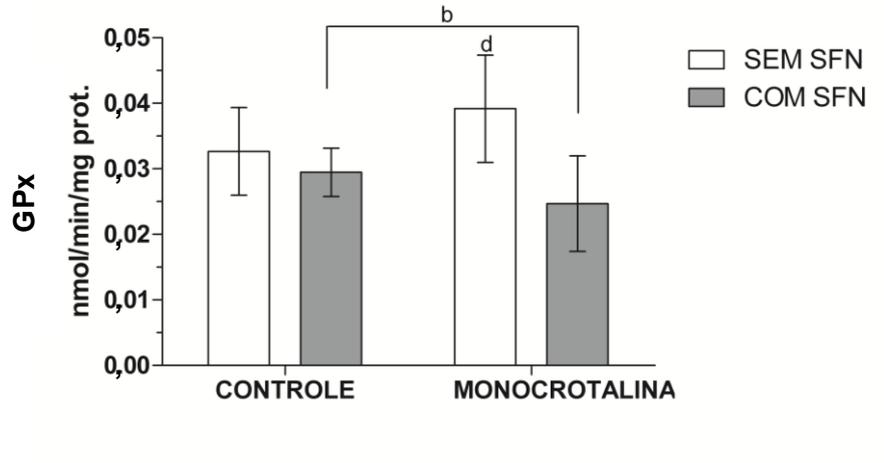


Figura 27. Atividade da enzima Glutaciona Peroxidase (GPx) no tecido ventricular direito de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm DP (n=6-7). ^b P<0,05 C e M versus CS e MS; ^d P<0,05 M versus MS.

5.4.5. Concentração de Glutaciona total

A capacidade antioxidante não enzimática avaliada pela concentração de glutaciona total apresentou alterações significativas apenas no grupo M. Comparado ao grupo C, houve uma redução de 49%, já em relação ao grupo MS essa redução foi de 46% no grupo M.

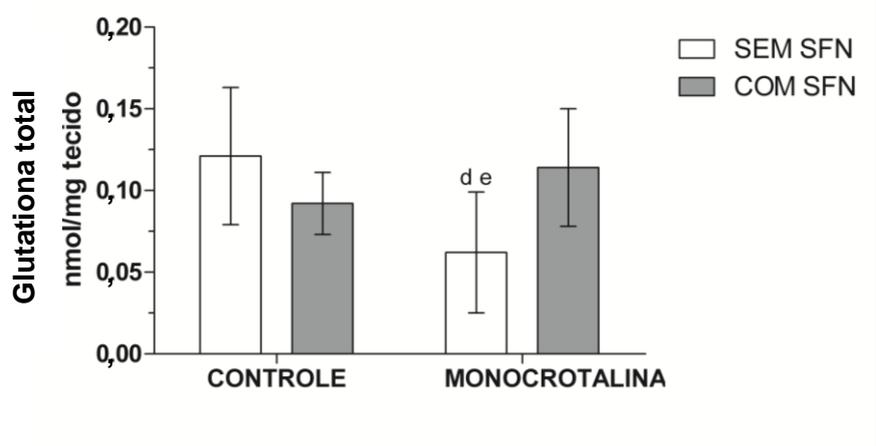


Figura 28. Concentração de Glutaciona Total no tecido ventricular direito de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm DP (n=5-6). ^d P<0,05 M versus MS; ^e P<0,05 M versus C.

5.4.6. Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)

Além da redução na concentração de glutathiona total, houve diminuição da fração reduzida (GSH) no grupo M comparado ao grupo C (58%), bem como comparado ao grupo MS (55%).

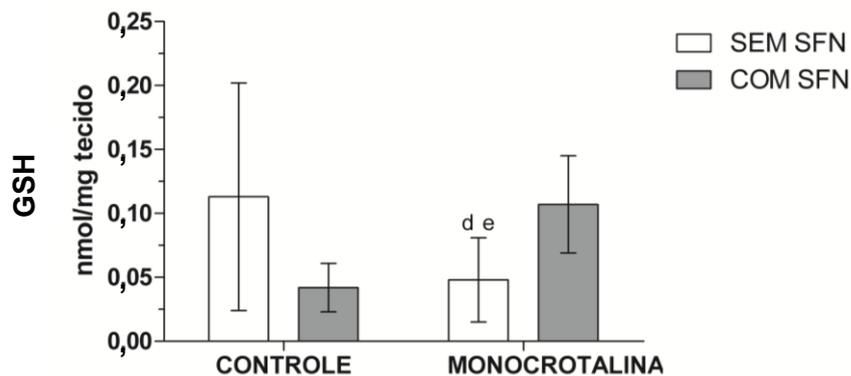


Figura 29. Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH) no tecido ventricular direito de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm DP (n=5-6). ^d P<0,05 M versus MS; ^e P<0,05 M versus C.

5.4.7. Estado Redox (GSH/GSSG)

A razão entre GSH e GSSG é um indicativo do estado redox das células. Neste experimento, a razão GSH/GSSG diminuiu 58% nos animais que receberam monocrotalina em relação ao controle. Por outro lado, o tratamento com sulforafano foi capaz de aumentar em 166% a razão GSH/GSSG nos grupos CS e MS em relação aos animais que não receberam a intervenção (C e M). O grupo M apresentou uma redução de 82% em relação ao C e 84% em relação ao grupo MS. O sulforafano aumentou em 6 vezes a razão GSH/GSSG do grupo MS em comparação com o grupo M.

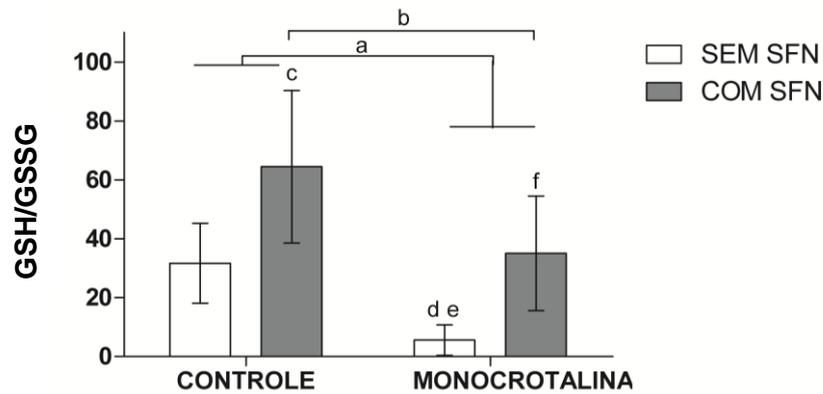


Figura 30. Estado redox (GSH/GSSG) no tecido ventricular direito de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm DP (n=5-6). ^a P<0,05 C e CS versus M e MS; ^b P<0,05 C e M versus CS e MS; ^c P<0,05 C versus CS; ^d P<0,05 M versus MS; ^e P<0,05 M versus C; ^f P<0,05 MS versus CS.

5.4.8. Lipoperoxidação

A quimiluminescência é um dos métodos mais sensíveis para a medida de lipoperoxidação. Neste estudo, os grupos não apresentaram diferenças significativas neste par

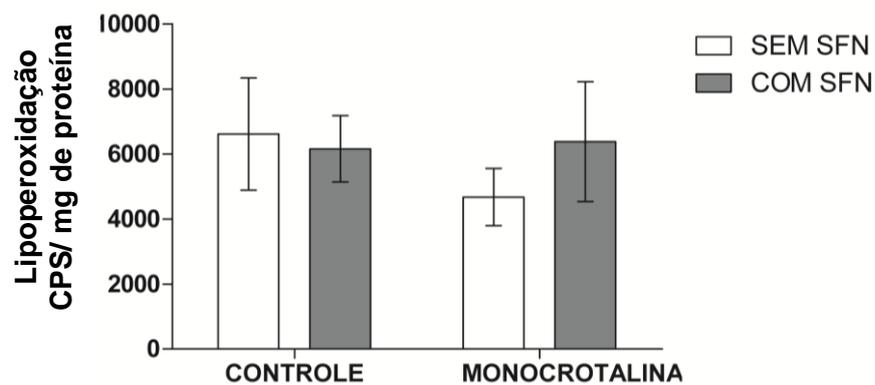


Figura 31. Lipoperoxidação por quimiluminescência no tecido ventricular direito de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Valores expressos como média \pm DP (n=6-9).

5.4.9. Imunoconteúdo da Proteína Heme-Oxigenase-1 (HO-1)

A expressão da enzima HO-1 diminuiu nos animais em que a HAP foi induzida. Os animais dos grupos M e MS tiveram uma redução de 35% em relação aos grupos C e CS. O grupo M apresentou uma redução de 36% em relação ao grupo C. No grupo MS, a redução foi de 33% em relação ao grupo CS.

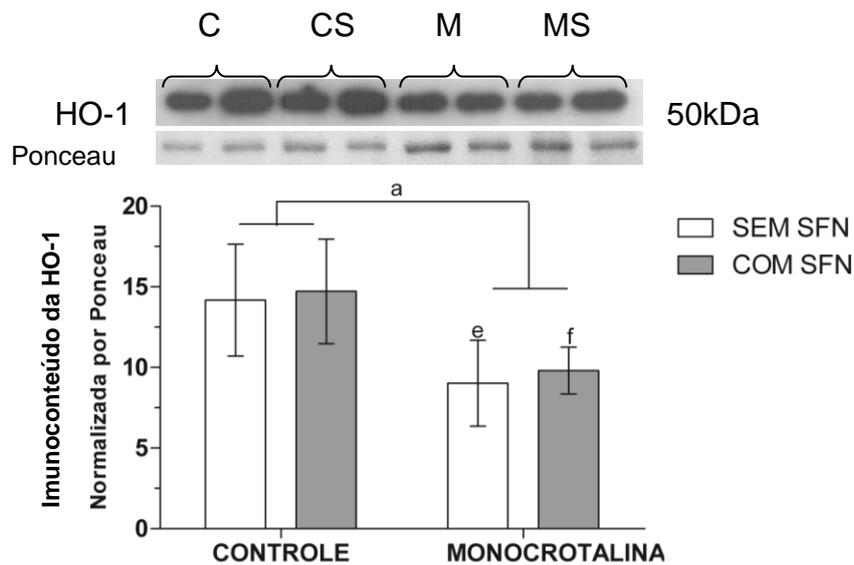


Figura 32. Imunoconteúdo da proteína Heme-oxigenase-1 (HO-1) no tecido ventricular direito de animais controle, tratados e não tratados com sulforafano e animais com monocrotalina, tratados e não tratados com sulforafano. Gel representativo de experimentos por *Western blot* mostrando 2 bandas para cada grupo experimental. Valores expressos como média \pm DP (n=4). ^a P<0,05 C e CS versus M e MS; ^e P<0,05 M versus C; ^f P<0,05 MS versus CS.

6. DISCUSSÃO

De acordo com nosso levantamento da literatura, este é o primeiro estudo que analisa os efeitos do sulforafano sobre o remodelamento e estresse oxidativo do ventrículo direito de ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina. Os principais achados deste estudo indicam que o sulforafano é capaz de promover alterações benéficas neste modelo. Essa resposta passa por um aumento nas defesas antioxidantes, resultando na melhora do equilíbrio redox celular verificado pela razão GSH/GSSG. Essas alterações bioquímicas estão relacionadas a uma melhora na função cardíaca avaliada pelo cateterismo da jugular direita e pela ecocardiografia transtorácica, melhorando especialmente a função sistólica do ventrículo direito, observado pelo TAPSE e pela redução na pressão sistólica.

O modelo experimental de monocrotalina em ratos, utilizado há mais de 40 anos, tem contribuído para a compreensão da fisiopatologia da HAP e para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas. Este modelo se caracteriza pelo aumento na resistência vascular pulmonar, provocando uma sobrecarga de pressão imposta ao ventrículo direito, hipertrofia e insuficiência cardíaca congestiva (GOMEZ-ARROYO et al., 2012; GUIHAIRE et al., 2013).

Outra marca deste modelo é a diminuição no ganho de massa corporal dos animais. Em nosso estudo, no início do protocolo os animais apresentavam massas semelhantes. No 7º dia após a injeção de monocrotalina, quando o tratamento com sulforafano foi iniciado, os animais que receberam a monocrotalina já apresentavam menor massa corporal que os animais controle e esta diferença permaneceu significativa ao final dos 21 dias. Esta característica foi encontrada em diversos trabalhos, sendo significativa a partir do 4º dia (PICHARDO et al., 1999) e mantendo-se após os 21 dias (PICHARDO et al., 1999; MORIMATSU et al., 2012; LUDKE et al., 2010; MOSELE et al., 2012).

Em relação à congestão hepática e pulmonar, fatores associados ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca, os animais que receberam monocrotalina não apresentaram alterações ao final dos 21 dias. Neste mesmo modelo, um estudo não encontrou alterações neste parâmetro 7 dias após a injeção. Já após 6 semanas, os animais apresentavam diferenças significativas em relação aos

controles (FARAHMAND; HILL; SINGAL, 2004). Em outro estudo, utilizando uma dose inferior de monocrotalina (50 mg/kg), também não foram encontradas diferenças aos 21 dias em relação aos animais controle (PICHARDO et al., 1999). Diante disso, não descartamos a possibilidade de que esse evento possa ocorrer em períodos subsequentes ao observado no nosso estudo.

Apesar de os animais não terem desenvolvido congestão pulmonar e hepática, foram observadas alterações na estrutura e na função do ventrículo direito. A hipertrofia do ventrículo direito é uma resposta compensatória à sobrecarga de pressão provocada pelas alterações vasculares na HAP. O ventrículo direito adapta-se ao aumento da pós-carga, aumentando a sua espessura de parede e a contratilidade (LEHRMAN et al, 2002). Em nosso estudo, os animais que receberam monocrotalina apresentaram aumento no índice de hipertrofia do ventrículo direito comparados aos animais controles, resultado semelhante ao que foi observado em outro estudo (COLOMBO et al., 2013).

Na grande maioria de pacientes os mecanismos compensatórios são insuficientes e evoluem para perda de função. Como já descrito, a manutenção da função ventricular direita é o principal determinante da capacidade funcional e sobrevida de pacientes com HAP (VAN DE VEERDONK et al., 2011). Neste estudo, a análise funcional foi realizada através da ecocardiografia transtorácica e do cateterismo cardíaco.

Não foram observadas alterações no volume sistólico e débito cardíaco nos animais que receberam a monocrotalina. Isto se deu provavelmente pela ativação de mecanismos compensatórios, neste caso, a hipertrofia e alterações de pressão e contratilidade. Dessa forma, o tempo de protocolo pode não ter sido suficiente para promover a insuficiência ventricular, comprometer o débito cardíaco e provocar congestão pulmonar e hepática. No entanto, alterações funcionais importantes foram observadas.

Em relação à função diastólica, embora a área do ventrículo direito na diástole não esteja alterada, foi observado redução na razão E/A nos animais que com monocrotalina. A razão entre a velocidade de enchimento inicial da tricúspide (rápido) e a velocidade de fluxo tricúspide decorrente da contração atrial (enchimento lento) pode ser um indicativo de alterações diastólicas no ventrículo direito (RUDSKI et al., 2010).

Nos animais doentes foi observado um aumento na área do ventrículo direito na sístole e um aumento do percentual do diâmetro do ventrículo direito em relação ao esquerdo. A FAC (Variação fracional da área) é um dos métodos mais recomendados para a estimativa quantitativa da função ventricular direita, com valor inferior de referência da normalidade de 35%. Esta medida tem demonstrado boa correlação com a fração de ejeção do ventrículo direito avaliada pela ressonância magnética cardíaca (RUDSKI et al., 2010). Neste estudo, a monocrotalina reduziu a FAC nos animais M e MS.

De forma semelhante, a FEC (fração de encurtamento) também foi reduzida. A fração de encurtamento baseia-se na relação entre os diâmetros transversais do ventrículo, obtidos no final da diástole e final da sístole. Já o IPM (índice de performance do miocárdio) não foi alterado pela monocrotalina. O IPM, também conhecido como índice de TEI, é uma estimativa da função global, tanto sistólica como diastólica do ventrículo direito. Ele é baseado na relação entre o trabalho desenvolvido na ejeção e não-ejeção do coração (RUDSKI et al., 2010).

Uma alteração importante provocada pela monocrotalina foi a redução no TAPSE (Excursão Sistólica do Plano do Anel Tricúspide). O TAPSE representa a função longitudinal do ventrículo direito e tem se mostrado um bom preditor de prognóstico na HAP (FORFIA et al., 2006).

Como explicado, o desenvolvimento do *Cor Pulmonale* é decorrente de alterações na vasculatura pulmonar, ao nível das arteríolas, que levam a um aumento progressivo da resistência vascular pulmonar, sobrecarregando o VD. (LEHRMAN et al., 2002).

Através do Doppler pulsátil, avaliamos o fluxo de sangue pela artéria pulmonar. Conforme a figura 7, observamos uma modificação do padrão da onda de fluxo pela artéria pulmonar nos animais que receberam a monocrotalina, com o pico de velocidade antecedendo a metade da sístole, associado ao aparecimento de um segundo pico ou “entalhe” ao final do período de ejeção, indicando que neste período a HAP encontra-se em um estágio moderado em ambos os grupos. Resultado semelhante foi encontrado no estudo Jones (2002) utilizando ratos *Sprague-Dawley* que receberam a mesma dose de monocrotalina utilizada em nosso estudo (60 mg/kg). Na avaliação ecocardiográfica, duas características de fluxo da artéria pulmonar estiveram relacionadas à progressão da hipertensão pulmonar nos ratos: a alteração na forma da onda e a diminuição no tempo de aceleração do fluxo

na artéria pulmonar. O aparecimento do “entalhe” ao final do período de ejeção foi encontrado a partir do 15º dia após a injeção de monocrotalina, tornando-se mais proeminente no 22º e 37º dia (JONES et al., 2002).

Além disso, calculamos a razão entre o tempo de aceleração e o tempo de ejeção do fluxo através da artéria pulmonar (TAc/TEj), parâmetro indicativo de resistência vascular pulmonar. A redução no tempo de aceleração associada ao aumento do tempo de ejeção nos animais que receberam monocrotalina em relação aos controles demonstra a redução da capacitância dos vasos pulmonares ao fluxo sanguíneo. A redução da razão TAc/TEj foi semelhante ao observado em outro trabalho neste modelo (MOSELE et al., 2012). Este resultado foi confirmado pelo cateterismo cardíaco, que é considerado padrão-ouro para a confirmação do diagnóstico de HAP em pacientes. Os animais apresentaram aumento na resistência vascular pulmonar em comparação aos animais controle.

O impacto do aumento da resistência vascular pulmonar sobre a função cardíaca foi demonstrado pela avaliação hemodinâmica, revelando aumento da pressão sistólica e diastólica final e da pressão média da artéria pulmonar nos animais que receberam monocrotalina, alterações acompanhadas por um aumento da contratilidade ($+dP/dt$) e do relaxamento ($-dP/dt$). Essas alterações hemodinâmicas são semelhantes a outros estudos que utilizaram esse modelo. O estudo de Jones (2002) observou um aumento temporal na pressão sistólica, com média de 42 mm/Hg no dia 22, atingindo 55 mm/Hg após 37 dias da injeção (JONES et al., 2002). O aumento nos índices de contratilidade e relaxamento foi semelhante ao encontrado no estudo de Colombo (2013) (COLOMBO et al., 2013). Essas alterações hemodinâmicas, com aumento da pressão sistólica e diastólica, da contratilidade e relaxamento e ainda a hipertrofia cardíaca funcionam como mecanismos compensatórios para manter o débito cardíaco nessa condição de resistência vascular pulmonar aumentada.

Alterações no estado redox celular tem sido associadas ao desenvolvimento do *Cor pulmonale* decorrente da HAP no modelo de monocrotalina. Modificações no perfil de espécies reativas e de antioxidantes celulares são encontradas tanto nas fases iniciais da doença, de adaptação compensatória, bem como na evolução para insuficiência do VD (FARAHMAND; HILL; SINGAL, 2004). A principal espécie reativa envolvida nesse processo é o H_2O_2 . Essa molécula exerce sua função sinalizadora devido à sua estabilidade e livre fluxo através das membranas. Dependendo da

concentração e do tipo de células, o H_2O_2 pode ter efeitos positivos, sinalizando para o aumento na produção de enzimas antioxidantes como forma de adaptação, bem como efeitos negativos, contribuindo para o desenvolvimento da aterosclerose, hipertrofia cardíaca e inflamação (VEAL; DAY; MORGAN, 2007). Estudos anteriores demonstraram a associação entre alterações no estado redox, concentrações de H_2O_2 e sinalização para hipertrofia cardíaca (ARAUJO et al., 2008).

No nosso estudo, as concentrações de H_2O_2 aumentaram nos grupos monocrotalina em relação aos controles, de forma semelhante ao que foi observado em outros estudos (MOSELE et al., 2012). Neste mesmo modelo, em um período mais longo, após 28 dias, Colombo (2015) encontrou um aumento nas concentrações de H_2O_2 , que foi relacionado a um aumento na sinalização pró-apoptótica no ventrículo direito (COLOMBO et al., 2015). O aumento do H_2O_2 encontrado no nosso estudo não foi acompanhado pela atividade da enzima SOD, que permaneceu inalterada. A monocrotalina diminuiu a atividade da enzima CAT e aumentou a atividade da GPx no ventrículo direito.

A razão GSH/GSSG apresentou drástica diminuição no grupo que recebeu a monocrotalina, resultado tanto de um aumento na concentração de glutatona oxidada, como pela redução na concentração de glutatona total e reduzida em relação aos controles. A razão GSH/GSSG é um importante indicativo do equilíbrio redox celular (WU et al., 2004), sugerindo um desequilíbrio redox nesses animais. Apesar disso, não foram detectadas alterações na lipoperoxidação do ventrículo direito dos animais com monocrotalina, diferente do que foi encontrado em outros estudos (MOSELE et al., 2012). Nosso resultado pode ser explicado pelo aumento da atividade da GPx. As enzimas antioxidantes apresentam cooperação sinérgica para manter a concentração de espécies reativas dentro de limites fisiológicos. CAT e SOD agem principalmente em regiões hidrofílicas, enquanto o sistema GPx atua em regiões hidrofóbicas, com especificidade para peróxidos de lipídeos (MICHIELS et al., 1994).

Ainda, a monocrotalina provocou a redução na expressão da enzima HO-1 no tecido cardíaco. Estudos tem demonstrado que a HO-1 desempenha um papel protetor em modelos de HAP. Os efeitos vasculares protetores de alguns compostos, como a sinvastatina e a rapamicina, foram atribuídos ao aumento da expressão e atividade da HO-1 no pulmão dos animais, e a utilização de inibidores

da atividade dessa enzima reduziu esses benefícios. (HSU et al., 2009; ZHOU et al., 2006; ZHANG et al., 2011).

Na tentativa de melhorar o perfil antioxidante e reverter os danos provocados pelo estresse oxidativo neste modelo, tratamos os animais com o isotiocianato sulforafano. Já está bem descrito na literatura o efeito antioxidante indireto do sulforafano, aumentando a capacidade antioxidante das células (FAHEY; TALALAY, 1999). No entanto, nenhum estudo na literatura avaliou o efeito do sulforafano na HAP.

A massa dos animais foi o primeiro aspecto avaliado em nosso estudo. Como descrito, a monocrotalina diminuiu o ganho de peso já no 7º dia após a injeção, quando o tratamento com sulforafano foi iniciado. O sulforafano não alterou o ganho de peso nos animais doentes, nem nos animais saudáveis.

A hipertrofia do VD é uma das características do remodelamento cardíaco na HAP. Neste trabalho, o tratamento com sulforafano atenuou o desenvolvimento da hipertrofia ventricular direita nos animais doentes. Esta alteração na resposta hipertrófica pode ser resultado da menor carga de trabalho à que o ventrículo direito foi exposto, demonstrado pela atenuação do aumento da resistência vascular pulmonar nos animais tratados, observada tanto através da ecocardiografia pela razão TAc/TEj como no cateterismo. O trabalho de Mosele (2012) corrobora com esta hipótese. Mosele observou uma correlação entre a hipertrofia ventricular direita e a resistência vascular pulmonar, reforçando o conceito de que o remodelamento ventricular hipertrófico corresponde a um mecanismo compensatório na tentativa de contrabalançar o aumento no estresse de parede imposto pela sobrecarga de pressão (MOSELE et al., 2012).

A ação do sulforafano ao nível pulmonar foi demonstrada pela manutenção da capacitância dos vasos pulmonares, atenuando o aumento na resistência vascular pulmonar. Isso explica o menor aumento na pressão sistólica e diastólica e na pressão média na artéria pulmonar encontrado nos animais tratados com sulforafano. Em consequência dessas alterações, o remodelamento cardíaco foi influenciado. A área ventricular sistólica que esteve aumentada no grupo M em relação ao controle, não foi alterada nos animais tratados (MS). Além disso, a redução na fração de encurtamento do VD (FEC) foi atenuada pelo tratamento.

Um importante efeito do sulforafano nos animais doentes observado na avaliação ecocardiográfica foi sobre o TAPSE. A Excursão Sistólica do plano Anular

Tricúspide expressa uma medida da função longitudinal, que demonstrado boa correlação com a função sistólica global do VD (RUDSKI et al., 2010). Nos animais doentes, o TAPSE reduziu significativamente e o tratamento com sulforafano foi capaz de reverter parcialmente esse desfecho.

A relevância do TAPSE em pacientes com HAP foi revelada em um estudo que avaliou 47 pacientes. Neste estudo, o TAPSE mostrou-se um bom indicador de prognóstico e preditor de sobrevivência, e para cada redução de 1 mm no TAPSE, o risco de morte aumentou em 17% (FORFIA et al., 2006). Em outro estudo com 53 pacientes com hipertensão pulmonar, o TAPSE permitiu estimar a fração de ejeção do ventrículo direito. Valores de maiores que 20 mm indicaram fração de ejeção preservada e valores inferiores à 15 mm indicaram redução da fração de ejeção com 100% de especificidade (SATO et al., 2013). Estes resultados demonstram a importância do TAPSE na avaliação da função ventricular direita na HAP. Neste sentido, a preservação do TAPSE nos animais tratados é um resultado interessante.

O estudo de Guazzi (2013) indicou que uma avaliação combinada do TAPSE e da pressão sistólica da artéria pulmonar pode ser um índice clínico útil da relação comprimento/força, e que a razão entre as variáveis pode revelar melhor o prognóstico e a gravidade da doença em comparação com ambas as variáveis isoladas (GUAZZI et al., 2013). Nesta perspectiva, o sulforafano também foi capaz de atenuar o aumento na pressão média na artéria pulmonar nos animais doentes.

Essas alterações funcionais benéficas foram acompanhadas por alterações bioquímicas. Os animais tratados com sulforafano (CS e MS) apresentaram menores concentrações de H_2O_2 no tecido cardíaco em relação aos não tratados (C e M). Nos animais que receberam monocrotalina, a atividade da CAT diminuiu, no entanto, o tratamento com sulforafano atenuou essa diminuição no grupo MS. Nestes animais a catalase pode estar sendo responsável pela metabolização do H_2O_2 , uma vez que o sulforafano diminuiu a atividade da GPx tanto no grupo controle (CS) como no grupo doente (MS). A maior ativação da GPx nos animais do grupo M pode ter sido responsável pela redução da razão GSH/GSSG, o que não ocorreu no grupo tratado com sulforafano.

A GPx remove o H_2O_2 acoplado sua redução à água com a oxidação da glutathiona reduzida (GSH) à sua forma oxidada (GSSG). O citosol é normalmente mantido em condições fortemente reduzidas, através da GSH, o principal e mais abundante tiol envolvido na defesa antioxidante celular, produzido em todos os

órgãos. A GSH tem alto poder redutor devido sua capacidade de doar prótons, podendo oxidar-se enzimática ou não enzimaticamente, gerando GSSG (BRIGELIUS-FLOHE, 1999).

As alterações nas concentrações de GSH parecem regular a sinalização redox, e modificações em seus níveis podem ser representadas pela razão GSH/GSSG. A relação entre a GSH e a GSSG tem sido bastante utilizada como parâmetro do estado redox celular (WU et al., 2004). Dessa forma, embora não tenha ocorrido lipoperoxidação em nenhum dos grupos, pode-se inferir que as reservas antioxidantes dos animais M estão reduzidas, e o tratamento com sulforafano impediu essa redução no grupo MS. De fato, o sulforafano é capaz de aumentar os níveis de glutathiona intracelular (FAHEY; TALALAY, 1999).

Também está bem descrito o papel do sulforafano como um indutor muito potente da enzima heme oxigenase-1 (HO-1) (PRESTERA et al., 1995). Em estudos anteriores, o sulforafano provocou aumento na expressão da HO-1 em cultura de cardiomiócitos e no tecido cardíaco em modelo de isquemia-reperfusão (FERNANDES et al., 2015; BONETTO et al., 2015). No entanto, neste trabalho o sulforafano não teve efeito sobre a expressão desta enzima.

7. CONCLUSÃO

É preciso ter cautela ao considerar os benefícios do sulforafano neste modelo. Muitas terapias estudadas em modelos animais demonstraram resultados positivos, que não se traduziram em benefícios clínicos em pacientes com HAP. Em uma revisão de 91 estudos que utilizaram o modelo de monocrotalina, terapias foram benéficas em 88 dos estudos (STENMARK et al., 2009). Esta pode ser uma falha do modelo, que não mimetiza todos os aspectos da HAP em humanos. Apesar disso, convém destacar que este foi modelo utilizado para determinar o efeito terapêutico de três classes principais de drogas atualmente utilizadas, especificamente os receptores antagonistas da endotelina, inibidores da fosfodiesterase e análogos da prostaciclina, o que justifica sua utilidade no estudo da HAP (NOGUERIA-FERREIRA et al., 2015).

Não temos informações suficientes para concluir se as alterações do estado redox no tecido cardíaco foram responsáveis pela melhora na função cardíaca dos animais tratados com sulforafano; ou se em razão da preservação da função, o coração desses animais foi capaz de preservar as defesas antioxidantes e o equilíbrio do estado redox.

As estimativas de resistência vascular pulmonar mostraram um menor aumento no grupo tratado em relação ao não tratado. Dessa forma, sugerimos que a sobrecarga imposta ao coração nos animais tratados foi menor, e por isso, este foi capaz de manter o mesmo débito cardíaco às custas de menores pressões sistólicas, conseqüentemente diminuindo a resposta hipertrófica. Ainda, sugerimos que esse período (21 dias após a injeção de monocrotalina) corresponda a um estágio de transição da hipertrofia compensatória para a insuficiência ventricular direita. Embora o débito cardíaco esteja preservado em ambos os grupos (M e MS), alterações como o aumento na pressão diastólica final, maior redução na fração de encurtamento e no TAPSE foram encontrados no grupo M, sugerindo um efeito benéfico modesto do sulforafano no remodelamento ventricular em resposta à HAP.

É preciso analisar em um próximo trabalho o efeito do sulforafano sobre o remodelamento vascular pulmonar, e qual a sua participação na atenuação do aumento na resistência vascular pulmonar encontrado neste estudo.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121-6, jan 1984

AGGARWAL, S. et al. Reactive Oxygen Species In Pulmonary Vascular Remodeling. **Comprehensive Physiology**. v. 3, n. 3, p. 1011–1034, jul 2013

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

ALVES, J. L. et al. Pulmonary Arterial Hypertension in the Southern Hemisphere Results From a Registry of Incident Brazilian Cases. **CHEST**, v. 147, n. 2, p. 495-501, 2015

ANGELONI, C. et al. Modulation of Phase II Enzymes by Sulforaphane: Implications for Its Cardioprotective Potential. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, p. 5615–5622, 2009

ARAUJO, A. S. et al. The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. **Journal of Molecular Endocrinology**. v. 41, n. 6, p. 423-30, dez 2008

ARCHER, S. L.; WIER, E. K.; WILKINS, M. R. The Basic Science of Pulmonary Arterial Hypertension for Clinicians: new concepts and experimental therapies. **Circulation**. v. 121, n. 18, p. 2045–2066, 2010

ARES, A. M.; NOZAL, M. J.; BERNAL, J. Extraction, chemical characterization and biological activity determination of broccoli health promoting compounds. **Journal of Chromatography A**. v. 1313, p. 78-95, 2013

AWDISH, R.; CAJIGAS, H. Definition, epidemiology and registries of pulmonary hypertension. **Heart Failure Reviews**, 2015, DOI 10.1007/s10741-015-9510-y

BABCOCK, G. T. How oxygen is activated and reduced in respiration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. v. 96, n. 23, p. 12971–12973, 1999

BAI, Y. et al. Sulforaphane Protects against Cardiovascular Disease via Nrf2 Activation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2015, Article ID 407580, 2015

BELHAJ, A. et al. Heme Oxygenase-1 and Inflammation in Experimental Right Ventricular Failure on Prolonged Overcirculation-Induced Pulmonary Hypertension. **PLoS One**. v. 8, n. 7, p. e69470, 2013

BOGAARD, H. J. et al. The Right Ventricle Under Pressure. **CHEST**, v. 804, p. 135-194, 2009

BONES A. M.; ROSSITER, J. T. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. **Phytochemistry**. v. 67, n. 11, p. 1053–1067, 2006

BONETTO, J. H. et al. Sulforaphane improves oxidative status without attenuating the inflammatory response or cardiac impairment induced by ischemia-reperfusion in rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 19, p. 1-9, 2015

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976

BRIGELIUS-FLOHE R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 27, p. 951–965, 1999.

BROWN, D. I.; GRIENGLING, K. K. Regulation of Signal Transduction by Reactive Oxygen Species in the Cardiovascular System. **Circulation Research**. v. 116, p. 531-549, 2015

BUCK, P. A. Origin and taxonomy of broccoli. **Economic Botany**. v. 10, n. 3, p. 250–253, 1956

CHAN, S. Y.; LOSCALZO, J. Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v. 44, p. 14–30, 2008

CHEMLA, D. et al. Haemodynamic evaluation of pulmonary hypertension. **European Respiratory Journal**. v. 20, p. 1314–1331, 2002

CIESLIK, E. et al. Effects of some technological processes on glucosinolate contents in cruciferous vegetables. **Food Chemistry**. v. 105, n. 3, p. 976–981, 2007

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**. v. 91, p. 38–44, 2013

COLOMBO, R. et al. Aerobic exercise promotes a decrease in right ventricle apoptotic proteins in experimental cor pulmonale. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 66, n. 3, p. 246-253, 2015

DEMARCO, V. G. Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. **World Journal of Cardiology**. v. 2, n.10, p. 316–324, 2010

FAHEY, J. W.; TALALAY, P. Antioxidant Functions of Sulforaphane: a Potent Inducer of Phase II Detoxication Enzymes. **Food and Chemical Toxicology**. v. 37, p. 973-979, 1999

FAHEY, J. W. et al. Protection of humans by plant glucosinolates: efficiency of conversion of glucosinolates to isothiocyanates by the gastrointestinal microflora. **Cancer Prev. Res.** v. 5, n. 4, p. 603-611, 2012

FAHEY, J. W.; ZALCMANN, A. T.; TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. **Phytochemistry**. v. 56, n. 1, p. 5-51, 2001

FAHEY, J. W.; ZHANG, Y.; TALALAY, P. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 94, n. 19, p. 10367–10372, 1997

FARAHMAND, F.; HILL, M. F.; SINGAL, P. K. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 260, n. 1-2, p. 21-29, maio 2004

FERNANDES, R. O. et al. Modulation of apoptosis by sulforaphane is associated with PGC-1 α stimulation and decreased oxidative stress in cardiac myoblasts. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 401, p. 61-70, mar 2015

FIGUEIREDO, S. M. et al. The Antioxidant Properties of Organosulfur Compounds (Sulforaphane). **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, v. 9, p. 24-39, 2015

FLOHE, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**. v. 105, p. 114-121, 1984

FORFIA, P. R. et al. Tricuspid Annular Displacement Predicts Survival in Pulmonary Hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 174. p. 1034–1041, 2006

FREUND-MICHEL, V. et al. Reactive oxygen species as therapeutic targets in pulmonary hypertension. **Therapeutic Advances in Respiratory Disease**. v. 7, n. 3, p. 175-200, 2013

GLADE, M. J.; MEGUID, M. M. A Glance at. Broccoli, glucoraphanin, and sulforaphane, **Nutrition**. v. 31, p. 1175–1178, 2015.

GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free radical biology & medicine**, v. 10, n. 2, p. 93–100, jan. 1991.

GOZZELINO, R.; JENEY, V.; SOARES, M. P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 50, p. 323-354, 2010

GU, Z.; GUO, Q.; GU, Y. Factors Influencing Glucoraphanin and Sulforaphane Formation in *Brassica* Plants: A Review. **Journal of Integrative Agriculture**. v. 11, n. 11, p. 1804-1816 nov 2012

GUAZZI, M. et al. Tricuspid annular plane systolic excursion and pulmonary arterial systolic pressure relationship in heart failure: an index of right ventricular contractile function and prognosis. **The American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**. v. 305, p. H1373–H1381, 2013

GUIHAIRE, J. et al. Experimental Models of Right Heart Failure: A Window for Translational Research in Pulmonary Hypertension. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 34, p. 689–699, 2013

GOMEZ-ARROYO, J. G. et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 302, p. L363–L369, 2012.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Ed 4. Clarendon Press, Oxford, 2006

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Measurement of reactive species. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed. Oxford University Press, Oxford, p. 268–340, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. **Methods in Enzymology**. v. 186, p. 1, 1990.

HARRISON, A.; HATTON, N.; RYAN, J. J. The right ventricle under: evaluating the adaptive and maladaptive changes in the right ventricle in pulmonary arterial hypertension using echocardiography (2013 Grover Conference series). **Pulmonary Circulation**, v. 1, p. 29-47, mar. 2015

HASSOUN, P. M. et al. Inflammation, Growth Factors, and Pulmonary Vascular Remodeling. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, n. 1, SUPPL S, p. S10-S19, jun. 2009

HOEPER, M. M. et al. Definitions and Diagnosis of Pulmonary Hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 25, p. D42–D50, dez. 2013.

HOEPER, M. M. et al. Treatment of pulmonary hypertension. **The Lancet Respiratory Medicine**. Publicado online. [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00542-1](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00542-1) mar. 2016

HOGG, N. ; KALYANAMARAN, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1411, p. 378-384, 1999

HOUGHTON, C. A.; FASSETT, R. G.; COOMBES, J. S. Sulforaphane and Other Nutrigenomic Nrf2 Activators: Can the Clinician's Expectation Be Matched by the Reality? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2016, Article ID 7857186, 2016

HSU, H. H. Simvastatin ameliorates established pulmonary hypertension through a heme oxygenase-1 dependent pathway in rats. **Respiratory Research**. v. 10, n. 32, 2009

HU, L. W. et al. Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling. **The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 285, p. 1473–1480, 2003

HU, R. et al. In Vivo Pharmacokinetics and Regulation of Gene Expression Profiles by Isothiocyanate Sulforaphane in the Rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 310, n. 1, p. 263-271, 2004

HUMBERT, M. et al. Cellular and Molecular Pathobiology of Pulmonary Arterial Hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 43, n. 12 SUPPL S, p. 13S-24S, jun. 2004.

HUMBERT, M. et al. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 173, n. 9, p. 1023-1030, 2006

HUMBERT, M. et al. Advances in Therapeutic Interventions for Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. **Circulation**, v. 130, p. 2189-2208 2014.

HUXTABLE, R. J. Activation and pulmonary toxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 47, p. 371-389, 1990

HYBERTSON, B. M. et al. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 32, p. 234–246, 2011

JONES, D. P. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. **Methods in Enzymology**. v. 348, p. 93–112, 2002

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 8, p.1865–1879, 2006.

JONES, J. E. et al. Serial noninvasive assessment of progressive pulmonary hypertension in a rat model. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 283, n. 1, p. H364–71, jul. 2002.

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

KENSLER, T. W. et al. Keap1–Nrf2 Signaling: A Target for Cancer Prevention by Sulforaphane. **Topics in Current Chemistry**. v. 329, p. 163–178, 2013

KIM, M. K.; PARK, J. H. Y. Conference on 'Multidisciplinary approaches to nutritional problems' Symposium on 'Nutrition and health' Cruciferous vegetable intake and the risk of human cancer: epidemiological evidence. **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 68, p.103–110, 2009

KLEIN D, KERN RM, SOKOL RZ. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. **Biochemistry Molecular Biology**. v. 36, p. 1, 1995

KOSKENVUO, J. W. et al. A comparison of echocardiography to invasive measurement in the evaluation of pulmonary arterial hypertension in a rat model. **The International Journal of Cardiovascular Imaging**. v. 26, n. 5, p. 509-518, 2010

LATTÉ, K. P.; APPEL, K-E.; LAMPEN, A. Health benefits and possible risks of broccoli – An overview. **Food Chem Toxicol**. v. 49, n. 12, p. 3287–3309, 2011

LEHRMAN, S. et al. Primary pulmonary hypertension and cor pulmonale. **Cardiology Reviews**. v. 10, n. 5, p. 265-278, 2002

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

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. v.193, p. 265-275, 1951.

LUDKE, A. R. et al. Modulation of monocrotaline-induced cor pulmonale by grape juice. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 55, n. 1, p. 89-95, 2010

MALENFANT, S. et al. Signal transduction in the development of pulmonary arterial hypertension. **Pulmonary Circulation**. v. 3, n. 2, p. 278-293, 2013

MARKLUND, S. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. **Boca Ranton. CRC Press.** p. 243-247, 1985

MASRI, F. A. et al. Deficiency of Lung Antioxidants in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. **Clinical and Translational Science Journal.** v.1, n. 2, p. 99-106, 2008

MATUSHESKI, N.V.; JUVIK, J. A.; JEFFERY, E.H. Heating decreases epithiospecifier protein activity and increases sulforaphane formation in broccoli. **Phytochemistry.** v. 65, p. 1273–1281, 2004

MCGOON, M. D. et al. Pulmonary Arterial Hypertension Epidemiology and Registries. **Journal of the American College of Cardiology,** v. 62, n. 25, p. D51–D59, dez. 2013.

MCLAUGHLIN, V. V.; DAVIS, M.; CORNWELL, W. Pulmonary Arterial Hypertension. **Current Problems in Cardiology.** v. 36, n. 12, p. 461–517, 2011

MICHIELS, C. et al. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine.** v. 17, n. 3, p. 235-248, set 1994

MORIMATSU, Y. et al. Development and Characterization of an Animal Model of Severe Pulmonary Arterial Hypertension. **Journal of Vascular Research.** v. 49, p. 33–42, 2012

MOSELE, F. et al. Effects of purple grape juice in the redox-sensitive modulation of right ventricular remodeling in a pulmonary arterial hypertension model. **Journal of Cardiovascular Pharmacology.** v. 60, n. 1, p. 15-22, 2012

NOGUEIRA-FERREIRA, R. et al. Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics,** v. 35, p. 8–16, 2015

PAK, O. et al. Animal models of pulmonary hypertension: role in translational research. **Drug Discovery Today: Disease Models,** v. 7, n. 3–4, p. 89-97, 2010

PALL, M. L.; LEVINE, S. Nrf2, a master regulator of detoxification and also antioxidant, anti-inflammatory and other cytoprotective mechanisms, is raised by

health promoting factors. **Acta Physiologica Sinica**. February 25, v. 67, n.1, p. 1–18, fev 2015

PÉREZ, C. et al. Optimization of a blanching step to maximize sulforaphane synthesis in broccoli florets. **Food Chemistry**. v. 145, p. 264–271, 2014

PIAO, C. S. et al. Sulforaphane protects ischemic injury of hearts through antioxidant pathway and mitochondrial KATP channels. **Pharmacological Research**. v. 61, p. 342–348, 2010

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

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunological Methods**. v. 38, n. 1-2, p. 161-70, 1980

PRESTERA T. et al. Parallel induction of heme oxygenase-1 and chemoprotective phase II enzymes by electrophiles and antioxidants: regulation by upstream antioxidant-responsive elements (ARE). **Molecular Medicine** v. 1, p. 827-837, 1995

PRISTERA, N. et al. The Role of Echocardiography in the Evaluation of Pulmonary Arterial Hypertension. **Echocardiography**. v. 33, p. 105–116, 2016

REDOUT, E. M. Antioxidant treatment attenuates pulmonary arterial hypertension-induced heart failure. **The American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**. v. 298, p. H1038–H1047, 2010

RHEE, S. G.; CHAE, H. Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free Radicals in Biology and Medicine**. v. 38, p. 1543-1552, 2005

RIEDL, M. A.; SAXON, A.; DIAZ-SANCHEZ, D. Oral Sulforaphane increases Phase II antioxidant enzymes in the human upper airway. **Clinical Immunology**. v. 130, n. 3, p. 244–251, mar 2009

ROBERTS, J. D.; FORFIA, P. R. Diagnosis and assessment of pulmonary vascular disease by Doppler echocardiography. **Pulmonary Circulation**. v. 1, n. 2, p. 160-181, 2011

RUDSKI, L. G. et al. Guidelines for the Echocardiographic Assessment of the Right Heart in Adults: A Report from the American Society of Echocardiography. **Journal of the American Society of Echocardiography**. v. 23, p. 685-713, jul 2010

RYAN, J. J.; MARSBOOM, G.; ARCHER, S. L. Rodent Models of Group 1 Pulmonary Hypertension. **Pharmacotherapy of Pulmonary Hypertension, Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 218, p. 105-149, 2013

SATO, T. et al. Simple prediction of right ventricular ejection fraction using tricuspid annular plane systolic excursion in pulmonary hypertension. **The International Journal of Cardiovascular Imaging**. v. 29, p. 1799–1805, 2013

SIES H. Oxidative Stress. **Oxidants and Antioxidants**. Academic Press, New York, 1991.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology Medicine**. v. 27, n.9-10, p. 916-921, 1999

SIMONNEUAU, G. et al. Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 62, n. 25 SUPPL., 2013

SINGAL, P. K. et al. Oxidative stress in congestive heart failure. **Current Cardiology Reports**. v. 2, n. 3, p. 206-11, 2000

SITBON, O. et al. Initial dual oral combination therapy in pulmonary arterial hypertension. **European Respiratory Journal**. In press | DOI: 10.1183/13993003.02043-2015, 2016

STENMARK, K. R. et al. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular Physiology**. v. 297, p. L1013–L1032, 2009

URBONIENE, D. et al. Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 299, n. 3, p. L401–12, set. 2010

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 39, p. 44–84, 2007

VAN DE VEERDONK, M.C. et al. Progressive right ventricular dysfunction in patients with pulmonary arterial hypertension responding to therapy. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 58, p. 2511–2519, 2011

VEAL, E. A.; DAY, A. M.; MORGAN, Hydrogen peroxide sensing and signaling. **Molecular Cell Review**. v. 26, p. 1-14, abr 2007

VONK-NOORDEGRAAF, A. et al. Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: Physiology and pathobiology. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 25 SUPPL., p. 22-33, 2013.

VOMHOF-DEKREY, E. E.; PICKLO SR, M. J. The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. **Journal of Nutritional Biochemistry**. n. 23, p. 1201–1206, 2012

WATSON, G. W. et al. Phytochemicals from Cruciferous Vegetables, Epigenetics, and Prostate Cancer Prevention. **The AAPS Journal**. v. 15, n. 4, p. 951-961, 2013

WU, G. et al. Glutathione metabolism and its implications for health. **The Journal of Nutrition**. v. 134, n. 3, p. 489-492, 2004

WU, M. L.; HO, Y.; YET, S. A Central Role of Heme Oxygenase-1 in Cardiovascular Protection. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 15, n. 7, p. 1835-1846, 2011

XU, D. et al. Exacerbated Pulmonary Arterial Hypertension and Right Ventricular Hypertrophy in Animals With Loss of Function of Extracellular Superoxide Dismutase. **Hypertension**. v. 58, p. 303-309, 2011

YANG, L. I. et al. Frugal chemoprevention: targeting Nrf2 with foods rich in sulforaphane. **Seminars in Oncology**. v. 43, p. 146–153, 2016

ZHANG, X. et al. Cruciferous vegetable consumption is associated with a reduced risk of total and cardiovascular disease mortality. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 94, n. 1, p. 240–246, 2011

ZHANG, W. H. et al. Simvastatin protects against the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats via a heme oxygenase-1-dependent pathway. **Experimental Lung Research**. v. 37, n. 8, p. 492-499, 2011

ZHOU, H. et al. Heme oxygenase-1 mediates the protective effects of rapamycin in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Laboratory Investigation**. v. 86, n. 1, p. 62-71, jan 2006

VAZQUEZ-PRIETO, M. A.; MIATELLO, R. M. Organosulfur compounds and cardiovascular disease. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 31, p. 540-545, 2010