

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Tese de Doutorado

EFEITOS DO BETABLOQUEADOR BUCINDOLOL NOS TECIDOS
PULMONAR E CARDÍACO EXPOSTOS À ATIVAÇÃO SUSTENTADA DO
SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO

Bruna Gazzi de Lima Seolin

Orientadora: Dr^a. Adriane Belló-Klein

Coorientador: Dr. Paulo Cavalheiro Schenkel

Porto Alegre, fevereiro de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Tese de Doutorado

**EFEITOS DO BETABLOQUEADOR BUCINDOLOL NOS TECIDOS
PULMONAR E CARDÍACO EXPOSTOS À ATIVAÇÃO SUSTENTADA DO
SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO**

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

Bruna Gazzi de Lima Seolin

Orientadora: Dr^a. Adriane Belló-Klein

Coorientador: Dr. Paulo Cavalheiro Schenkel

Porto Alegre, fevereiro de 2019

“É nos momentos de decisão que o seu destino é traçado.”

Anthony Robbins

AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a **Deus**, por ter me dado a chance de ser aquilo que escolhi, e por ter confiado a mim a possibilidade de ensinar.*

*Aos meus pais, **Reno** e **Ivete**, por sempre acreditarem em mim e por todo o apoio. Vocês são um grande exemplo de família, de vida, de força e de energia infinita. Obrigada por me fazerem quem eu sou, perseverante e otimista.*

*À minha irmã **Sabrina** por estar sempre presente em minha vida, torcendo pelo meu sucesso. Obrigada pelos seus abraços e palavras, sempre cheios de coragem e amor.*

*Aos meu afilhado e sobrinho **Rafael**, por ser uma das minhas maiores motivações para ser uma pessoa sempre melhor e cheia de garra. E ao meu sobrinho **Vicente**, pelas gargalhadas que me rouba.*

*Ao meu marido **Vinícius**. Nenhuma palavra seria o suficiente para agradecer tua ajuda em todos esses anos. Se hoje me sinto uma pessoa melhor e mais preparada para o que virá, agradeço a ti. Trilhar a vida contigo torna tudo mais fácil, mais leve e muito melhor. Te amo, “infinito”!*

*Ao meu pequeno e cheio de energia, **Sagu**. Com suas lambidas e animação faz meu dia começar e terminar sempre com um sorriso. Obrigada por fazer parte da minha vida, destruir nossa casa, encher ela de pelos e de amor.*

*À minha amiga **Lara**, por toda sua importância na minha vida. Agradeço por te ter ao meu lado, compartilhando essa trajetória chamada vida.*

*Aos demais **familiares**, agradeço pela compreensão nos momentos de ausência.*

Ao **Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFRGS**, pelo acolhimento, por estarem sempre dispostos a ajudar e a compartilhar o conhecimento, pelas amizades e brincadeiras. Vocês deixaram suas marcas não somente nesta tese, mas na minha vida.

Aos meus incríveis coorientandos, **Luiza e Matheus**, obrigada por levarem os meus (nossos) resultados adiante, sempre com entusiasmo. Obrigada por me deixarem ensinar, e por me ensinarem.

I thank you **Dr. Neelam Khaper**, “my Canadian supervisor”, for all opportunities and welcome during all periods that I was in Canada. You were an example of a researcher, and one of the most incredible people that I met. Thank you for letting me be a part of your life.

Thank you all colleagues at NOSM, especially **Ashley**, my amazing friend for laughter and experiments that never ended.

Thank you all friends that I met in Canada, especially Gerilyn and Anacleto. You make me feel at home.

Em especial, meus agradecimentos e admiração à minha orientadora **Profa. Adriane Belló-Klein**. Por ter me recebido em seu laboratório, e por todas as palavras de incentivo. Obrigada por acreditar em mim, pelas inúmeras oportunidades a mim dada, pela orientação incansável e por me dar todo o suporte para que eu alcançasse voo. Agradeço por ter cruzado o caminho de uma pesquisadora, orientadora e pessoa como você. Obrigada também ao meu Coorientador, **Prof. Paulo Cavalheiro Schenkel**, pelo incentivo de sempre. Por fim, dedico meu respeito aos animais que fizeram parte deste estudo.

Um ciclo que se encerra e outro que se inicia.

RESUMO

Objetivos: Verificar o papel do bucindolol, um bloqueador adrenérgico β_1 , β_2 e α_1 e agente simpatolítico, sobre a disfunção endotelial e remodelamento vascular pulmonar em ratos Wistar com Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP) (estudo *in vivo*), bem como sobre vias de sinalização para hipertrofia/sobrevivência e morte celular em células cardíacas H9c2 expostas à noradrenalina (estudo *in vitro*).

Materiais e Métodos: No estudo *in vivo*, os animais foram divididos nos grupos: controle (CTR), monocrotalina (MCT), controle+bucindolol (CTR+BCD) e monocrotalina+bucindolol (MCT+BCD). A HAP foi induzida através de uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de monocrotalina (60 mg/kg). Após duas semanas, os animais foram tratados por sete dias com bucindolol (2 mg/kg/dia – i.p.) ou veículo. Ao final do tratamento, os animais foram submetidos à ecocardiografia para avaliação da resistência vascular pulmonar (RVP) e índice de *performance* do miocárdio (IPM). Os pulmões foram coletados para análise do estresse oxidativo e análises por western blot. As artérias pulmonares foram coletadas para as análises histológicas e de imunohistoquímica. No estudo *in vitro*, os seguintes grupos foram estabelecidos: controle (CTL), noradrenalina (NE), controle+bucindolol (CTL+BCD) e noradrenalina+bucindolol (NE+BCD), onde as células H9c2 foram incubadas com noradrenalina (10 μ M por 24 h) na presença ou ausência de bucindolol (10 μ M por 8 h). O western blot foi utilizado para determinar a expressão das proteínas de hipertrofia/sobrevivência, de morte celular (autofagia e apoptose) e para estimar a lipoperoxidação (4-HNE). A citometria de fluxo foi utilizada para mensurar a atividade da caspase-3/7 e as espécies reativas de oxigênio (EROs). **Resultados:**

No estudo *in vivo*, o grupo MCT+BCD demonstrou menor (32%) expressão do receptor de endotelina-1 A (ETAR) e da razão ETAR / ETBR (62%) quando comparado com o grupo MCT. O tratamento com bucindolol não alterou o estresse oxidativo, determinado pela expressão/atividade das enzimas antioxidantes e lipoperoxidação, e a expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e diminuiu os níveis de nitrotirosina em homogeneizados de pulmão. O bucindolol foi capaz de melhorar o remodelamento da vasculatura pulmonar no grupo MCT+BCD, reduzindo a RVP (21%) e o IPM em relação ao grupo MCT. No estudo *in vitro*, o grupo NE+BCD apresentou redução na sinalização para hipertrofia, observada através da inferior expressão/atividade de proteínas como o transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3), a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e a p70 S6 kinase (p70 S6K), quando comparado com o grupo NE. O tratamento com bucindolol promoveu o aumento da autofagia, evidenciado pelo aumento da razão da proteína associada ao microtúbulo de cadeia leve 3 (LC3-II) / LC3-I. O grupo NE+BCD apresentou redução na apoptose em relação ao grupo NE, observada pela diminuição da ativação da caspase 3/7. O bucindolol também foi eficaz em reduzir as EROs e a lipoperoxidação no grupo NE+BCD quando comparado ao grupo NE.

Conclusão: O bucindolol foi capaz de atenuar o remodelamento vascular pulmonar através da redução do ETAR e, conseqüentemente, reduzir a RVP e o IPM em animais com HAP. Além disso, este betabloqueador foi capaz de reduzir a sinalização para hipertrofia e apoptose nas células H9c2, possivelmente por redução do estresse oxidativo. Em resumo, o papel protetor do bucindolol foi demonstrado em ambos experimentos, *in vivo* e *in vitro*, em resposta à hiperativação simpática, seja por HAP ou por exposição direta à noradrenalina.

ABSTRACT

Aim: To verify the role of bucindolol, a β 1-, β 2- and α 1-blocker and sympatholytic agent, on endothelial dysfunction and pulmonary vascular remodeling in Wistar rats with PAH (*in vivo* study), as well as signaling pathways for hypertrophy/survival and cell death in H9c2 cardiac cells exposed to norepinephrine (*in vitro* study). **Materials and Methods:** In the *in vivo* study, the animals were divided into the following groups: control (CTR), monocrotaline (MCT), control+bucindolol (CTR+BCD), and monocrotaline+bucindolol (MCT+BCD). PAH was induced by a single intraperitoneal (i.p.) injection of monocrotaline (60 mg/kg). After two weeks, animals were treated for seven days with bucindolol (2 mg/kg/day - i.p.) or vehicle. At the end of the treatment, animals were submitted to echocardiographic assessment for evaluation of pulmonary vascular resistance (PVR) and myocardial performance index (MPI). The lungs were collected for analysis of oxidative stress and western blot. Pulmonary arteries were collected for histological and immunohistochemical analyzes. In the *in vitro* study, the following groups were established: control (CTL), norepinephrine (NE), control+bucindolol (CTL+BCD), and norepinephrine+bucindolol (NE+BCD), where H9c2 cells were incubated with norepinephrine (10 μ M for 24 h) in the presence or absence of bucindolol (10 μ M for 8 h). Western blot was used to determine the expression of hypertrophic/survival proteins, cell death (autophagy and apoptosis) and to estimate lipoperoxidation (4-HNE). Flow cytometry was used to measure the activity of caspase-3/7 and reactive oxygen species (ROS). **Results:** In the *in vivo* study, the MCT+BCD group showed lower (32%) endothelin-1 A receptor (ETAR) and ETAR/ETBR ratio (62%) when compared to the MCT group. Treatment with bucindolol did not alter oxidative stress, as determined by the

expression/activity of antioxidant enzymes and lipoperoxidation, and the expression of the enzyme endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and decreased levels of nitrotyrosine in lung homogenates. Bucindolol was able to improve pulmonary vasculature remodeling in the MCT+BCD group, reducing PVR (21%) and MPI in relation to the MCT group. In the *in vitro* study, the NE+BCD group showed reduced signaling for hypertrophy, evidenced through the lower expression/activity of proteins, such as the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), and p70 S6 kinase (p70 S6K) when compared to the NE group. Treatment with bucindolol promoted increased autophagy, evidenced by increased expression of the protein associated with the microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3-II) / LC3-I ratio. The NE+BCD group presented reduction in apoptosis in relation to the NE group, observed by the decrease of the caspase 3/7 activation. Bucindolol was also effective in reducing ROS and lipoperoxidation in the NE+BCD group, when compared to the NE group. **Conclusion:** Bucindolol was able to attenuate pulmonary vascular remodeling by reducing the ETAR and, consequently, reducing PVR and MPI in animals with PAH. In addition, this beta-blocker was able to decrease the signaling for hypertrophy and apoptosis in H9c2 cells, probably by reducing oxidative stress. In summary, the protective role of bucindolol was demonstrated both *in vivo* and *in vitro* experiments, in response to sympathetic hyperactivation by PAH or by direct exposure to norepinephrine.

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1: Artéria pulmonar em uma situação normal e na hipertensão arterial pulmonar.

Figura 2: Ventrículo direito em uma situação normal e na hipertensão arterial pulmonar de acordo com a Lei de *Laplace*.

Figura 3: Sistema nervoso simpático na hipertensão arterial pulmonar.

Figura 4: Foto da vagem, das sementes e das flores das espécies pertencentes ao gênero *Crotalaria*.

Figura 5: Desenho experimental do estudo *in vivo*.

Figura 6: Desenho experimental do estudo *in vitro*.

Tabela 1: Comparação da ação dos principais betabloqueadores.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HNE: 4-hidroxinonenal

AMPK: proteína cinase ativada por adenosina monofosfato

Akt: proteína quinase B

AT/ET: tempo de aceleração pelo tempo de ejeção através da artéria pulmonar

Bax: proteína X associada à Bcl-2

Bcl-2: célula-β de linfoma 2

CAT: catalase

CTL: grupo controle (estudo *in vitro*)

CTL+BCD: grupo controle+bucindolol (estudo *in vitro*)

CTR: grupo controle (estudo *in vivo*)

CTR+BCD: grupo controle+bucindolol (estudo *in vivo*)

O₂^{•-}: ânion superóxido

eNOS: enzima óxido nítrico sintase endotelial

EROs: espécies reativas de oxigênio

ET-1: endotelina-1

ETAR: receptores A da endotelina-1

ETBR: receptores B da endotelina-1

FBS: soro fetal bovino

GPx: glutathione peroxidase

H9c2: mioblastos cardíacos de ventrículo de rato

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HAP: hipertensão arterial pulmonar

HP: hipertensão pulmonar

IC: insuficiência cardíaca

IP: iodeto de propídio

i.p.: intraperitoneal

IPM: índice de *performance* do miocárdio

LC3-I: proteína associada ao microtúbulo 1 de cadeia leve 3

MCT: grupo monocrotalina (estudo *in vivo*)

MCT+BCD: grupo monocrotalina+bucindolol (estudo *in vivo*)

NE: grupo noradrenalina (estudo *in vitro*)

NE+BCD: grupo noradrenalina+bucindolol (estudo *in vitro*)

mTOR: proteína alvo da rapamicina nos mamíferos

NO: óxido nítrico

PAPm: pressão arterial pulmonar média

PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase

OONO⁻: peroxinitrito

p70 S6K: p70 S6 kinase

RVP: resistência vascular pulmonar

SNS: sistema nervoso simpático

SOD: superóxido dismutase

STAT3: transdutor de sinal e ativador da transcrição 3

VD: ventrículo direito

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. HIPERTENSÃO PULMONAR	15
1.2. HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR.....	15
1.2.1. Epidemiologia	16
1.2.2. Fisiopatologia.....	17
1.2.3. Tratamento	20
1.3. SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO NA HAP	21
1.4. MECANISMOS DE MORTE CELULAR NAS DOENÇAS CARDÍACAS	22
1.4.1. Morte Celular	22
1.4.2. Autofagia	23
1.4.3. Apoptose	26
1.5. MODELOS EXPERIMENTAIS	22
1.5.1. Estudo <i>In Vivo</i>	28
1.5.2. Estudo <i>In Vitro</i>	30
1.5.3. Apoptose	26
1.6. BLOQUEADORES ADRENÉRGICOS	30
1.6.1. A Utilização de Betabloqueadores na Hipertensão Pulmonar	30
1.6.2. Betabloqueador Bucindolol	32
2. FORMULAÇÃO DO PROBLEMA	34
3. HIPÓTESE	34
4. OBJETIVOS	36
4.1. OBJETIVO GERAL	36
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5. MATERIAIS E MÉTODOS DO ESTUDO <i>IN VIVO</i>	39

5.1. ANIMAIS	39
5.2. CÁLCULO AMOSTRAL	39
5.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS	40
5.4. BIOÉTICA COM OS ANIMAIS	40
5.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	41
5.5.1. Ambientação dos Animais	41
5.5.2. Administração da Monocrotalina.....	41
5.5.3. Administração do Betabloqueador Bucindolol.....	41
5.5.4. Eutanásia dos Animais.....	42
5.6. ANÁLISES MORFOMÉTRICAS E FUNCIONAIS	43
5.6.2. Peso Corporal	43
5.6.2. Ecocardiografia.....	44
5.6.3. Coleta dos Tecidos	44
5.6.4. Avaliação da Hipertrofia Cardíaca	45
5.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	45
5.7.1. Homogeneização do Pulmão	45
5.7.2. Quantificação de Proteínas e Concentração de Hemoglobina	45
5.7.3. Avaliação das Enzimas Antioxidantes e Lipoperoxidação	46
5.8 ANÁLISES DA EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN BLOT.....	48
6. MATERIAIS E MÉTODOS DO ESTUDO <i>IN VITRO</i>	50
6.1. CULTURA CELULAR DE LINHAGEM.....	50
6.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS	51
6.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	51
6.3.1. Incubação com Noradrenalina	51
6.3.2. Tratamento com o Betabloqueador Bucindolol.....	52
6.4. ANÁLISES MOLECULARES	53

6.4.1. Avaliação da Proliferação/Viabilidade Celular	53
6.4.2. Análise da Expressão Proteica por Western Blot.....	54
6.4.3. Atividade da Caspase-3/7 via Citometria de Fluxo	55
6.4.4. Análise da Morte Celular por Iodeto de Propídio via Citometria de Fluxo	56
6.4.5. Espécies Reativas de Oxigênio via Citometria de Fluxo.....	56
7. BIOSSEGURANÇA	57
8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
9. RESULTADOS.....	58
10. DISCUSSÃO	59
11. CONCLUSÃO	67
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXO A – ARTIGO <i>IN VIVO</i>	86
ANEXO B – ARTIGO <i>IN VITRO</i>	97

1. INTRODUÇÃO

1.1. HIPERTENSÃO PULMONAR

A hipertensão pulmonar (HP) é uma doença progressiva e incapacitante (Hoepfer e Granton, 2011), caracterizada pelo remodelamento e aumento da resistência da vasculatura pulmonar, com conseqüente sobrecarga do ventrículo direito (VD) (Austin *et al.*, 2013).

Clinicamente, a HP pode ser diagnosticada através do cateterismo do VD, pela constatação de uma pressão arterial pulmonar média (PAPm) igual ou acima de 25 mmHg em repouso, em uma situação de pressão de oclusão da artéria pulmonar \leq 15 mmHg, com resistência vascular pulmonar (RVP) $>$ 3 unidades Wood (Badesh *et al.*, 2009; Montani *et al.*, 2013). O valor normal da PAPm em repouso é 14 ± 3.3 mmHg, tendo como limite superior normal o valor de 20 mmHg. Pressões situadas entre 21 e 24 mmHg devem ser monitoradas, particularmente quando identificados riscos para o desenvolvimento da doença (Hoepfer *et al.*, 2013).

A classificação mais atual da HP da doença, apresentada em 2013, no V Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar, a divide em cinco grupos de acordo com semelhanças em seus mecanismos fisiopatológicos, quadro clínico e tratamento: (1) hipertensão arterial pulmonar (HAP), (2) hipertensão pulmonar causada por doenças cardíacas do lado esquerdo, (3) hipertensão pulmonar devido a doenças pulmonares e/ou hipóxia, (4) hipertensão pulmonar tromboembólica crônica e (5) hipertensão pulmonar com mecanismos multifatoriais ou não esclarecidos. Em relação à HAP, grupo 1, sua origem pode ocorrer das seguintes formas: idiopática, hereditária, induzida por drogas ou toxinas, ou ser decorrente de

condições associadas (HIV, doenças do tecido conjuntivo, hipertensão portal, esquistossomose e doença cardíaca congênita) (Simonneau *et al.*, 2013).

1.2. HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

1.2.1. Epidemiologia

Em decorrência das múltiplas etiologias e diferentes classificações, a exata prevalência da HAP é desconhecida. A HAP é uma doença que afeta cerca de 15 - 26 pessoas por milhão de adultos, com incidência de 10,7 novos casos por ano (Humbert *et al.*, 2006; Peacock *et al.*, 2007; Ling *et al.*, 2012; Jansa *et al.*, 2014). Aproximadamente 100 mil indivíduos são afetados pela HAP em todo o mundo, não incluindo a HAP associada à esquistossomose e ao HIV, doenças proeminentes em algumas regiões do mundo, como a América do Sul e África. Dessa forma, acredita-se que o número de indivíduos afetados possa estar largamente subestimado (Mocumbi *et al.*, 2005).

Em um estudo retrospectivo realizado no Japão, os pacientes apresentaram média de sobrevivência de $14,9 \pm 0,8$ anos com taxas de sobrevivência em 1, 5 e 10 anos de 98 %, 96 % e 78 %, respectivamente (Ogawa *et al.* 2014). Um aumento na idade média do diagnóstico de HAP foi relatado, passando de 35 ± 15 (Rich *et al.*, 1987) para 65 ± 15 anos em estudos prospectivos, como o Registro Prospectivo de Terapias Recém Iniciadas para Hipertensão Pulmonar (COMPERA) (Hoepfer *et al.*, 2013).

Dados de um estudo prospectivo de casos incidentes entre 2008 e 2013, realizado no Instituto do Coração da Universidade de São Paulo, demonstram que a

idade média de pacientes com HAP no momento do diagnóstico é de 46 anos, com uma razão de mulheres para cada homem de 3:1, sendo 28,7 % com HAP idiopática e com sobrevivência de 74 % em três anos (Alves *et al.*, 2015).

1.2.2. Fisiopatologia

A circulação pulmonar é caracterizada por apresentar uma baixa pressão, ser altamente distensível, com alta capacidade de volume e baixa resistência ao fluxo sanguíneo (Chemla *et al.*, 2002). A HAP é caracterizada pelo aumento progressivo da velocidade do fluxo sanguíneo, aumento do tônus vascular e da RVP, geralmente, em decorrência de mecanismos que envolvem vasoconstrição (Boogard *et al.*, 2009) e remodelamento de pequenas artérias e arteríolas pulmonares (Runo e Loyd, 2003). Seu mecanismo patogênico preciso é desconhecido, devido a sua fisiopatologia ser multifatorial (Rabinovitch, 2008). Contudo, sugere-se que essa resposta seja desencadeada por um sinal inflamatório inicial (Liao, 2013), levando à superexpressão de substâncias vasoconstritoras como a endotelina-1 (ET-1), e ao prejuízo crônico na produção de vasodilatadores, tais como óxido nítrico (NO) (Vaillancourt *et al.*, 2014).

A ET-1 apresenta ação vasoconstritora na circulação sistêmica e pulmonar, sendo reconhecida como um dos principais moduladores da homeostase vascular (Fukuroda *et al.*, 1994). Além disso, a ET-1 estimula a produção de fatores de crescimento (Pedram *et al.*, 1997) e apresenta atividade mitogênica no músculo liso vascular (Zamora *et al.*, 1993). Os receptores A da ET-1 (ETAR) são encontrados nas células do músculo liso vascular. Por outro lado, os receptores B da ET-1

(ETBR) são encontrados tanto nas células do músculo liso vascular quanto em células endoteliais (Galiè *et al.*, 2004). Ao se ligar aos receptores endoteliais, há sinalização para produção de NO. Quando a ligação da ET-1 se dá nos receptores encontrados no músculo liso, medeia-se a vasoconstrição e a proliferação, além da estimulação de inflamação local (Baliga *et al.*, 2013).

O NO é um gás solúvel, altamente lipofílico e considerado radical livre. Sua síntese ocorre nas células do endotélio vascular sob ação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Crosswhite e Sun, 2010). Além de ser um potente vasodilatador, o NO é capaz de neutralizar as espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, a reação do NO com ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) dá origem ao peroxinitrito ($OONO^-$), capaz de oxidar proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos (Delbin *et al.*, 2009). Acredita-se que a produção de $O_2^{\cdot-}$ pode ser mediada pela ET-1 (Lassègue e Clempus, 2010). O $O_2^{\cdot-}$, através da redução da biodisponibilidade de NO, é capaz de ativar moléculas de sinalização intracelular e fatores de transcrição envolvidos com o processo de inflamação e remodelamento vascular (Granger *et al.*, 2010). Este desequilíbrio entre vasodilatadores e vasoconstritores, promove um aumento da espessura da camada muscular lisa (túnica média), e remodelamento da túnica adventícia. Histologicamente, a HP é caracterizada por muscularização das artérias periféricas, hipertrofia da túnica média das artérias, perda de pré-capilares no componente arterial da circulação pulmonar e a formação de neoíntima (Newby, 2006) (Figura 1). Além disto, relata-se uma deposição excessiva de trombina relacionada a um estado pró-coagulante, colaborando para o aumento da RVP resultante da lesão endotelial (Shulman *et al.*, 1993).

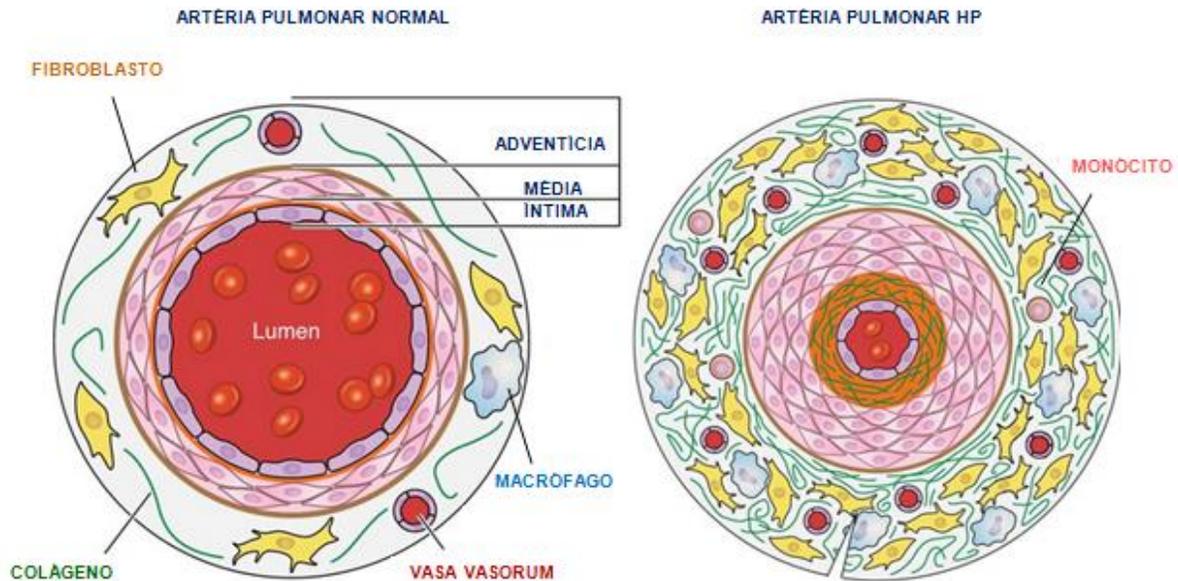


Figura 1: Artéria pulmonar em uma situação normal e na hipertensão arterial pulmonar.

(Retirado e adaptado de Pugliese *et al.*, 2015)

Em resposta ao aumento da RVP, o VD sofre rápidas adaptações estruturais e funcionais (Gomez-Arroyo *et al.*, 2012). Para que ocorra a manutenção do débito cardíaco, há aumento da espessura da parede por hipertrofia (Boogard *et al.*, 2009) (Figura 2) e aumento da contratilidade. Não sendo capaz de sustentar esta sobrecarga por longo prazo, há diminuição da força de contração cardíaca e o VD dilata (Hein *et al.*, 2003). Simultaneamente há diminuição da perfusão do VD, seguindo um ciclo vicioso que leva à diminuição da capacidade funcional deste ventrículo (Casserly e Klinger, 2009). O índice de *performance* do miocárdio (IPM), uma medida não invasiva que representa a função sistólica e diastólica do VD, é uma das mais importantes ferramentas para avaliação do prognóstico nos quadros

de HAP, visto sua correlação positiva com a PAPm e a resposta ao tratamento (Dyer *et al.*, 2006).

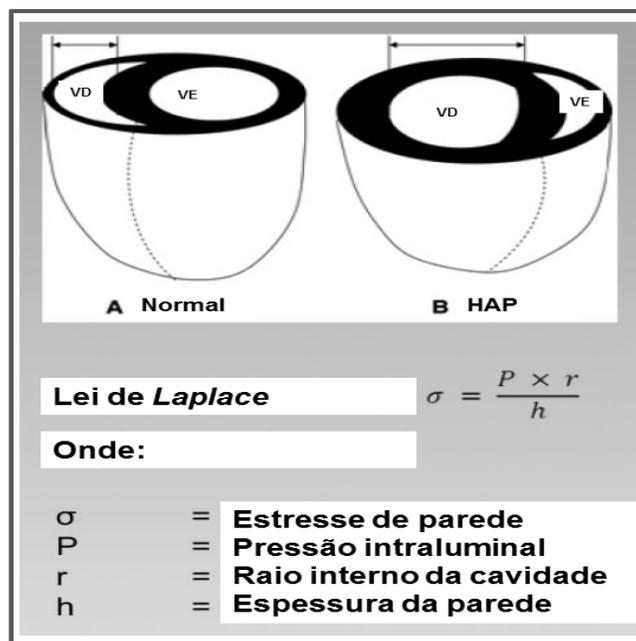


Figura 2: Ventrículo direito em uma situação normal e na hipertensão arterial pulmonar de acordo com a Lei de *Laplace*.

(Retirado e adaptado de Boogard *et al.*, 2009)

1.2.3. Tratamento

Nos últimos anos, a comunidade científica tem se direcionado no sentido de definir um tratamento efetivo para a HAP. As opções terapêuticas para tratamento da HAP existentes no momento são: oxigenioterapia, diuréticos, anticoagulantes ou agentes antiplaquetários, fármacos vasodilatadores, digitálicos e opções cirúrgicas (Gurtu e Michelakis, 2015; Galiè *et al.*, 2015). No entanto, a HAP é uma doença caracterizada também por remodelamento vascular proliferativo, alterações estruturais e funcionais no VD (Boogard *et al.*, 2009) e aumento da produção de

EROs pulmonar e cardíaca (Liao, 2013), e não somente por vasoconstrição. Portanto, as terapias utilizadas atualmente promovem apenas uma melhora da qualidade de vida (McLaughlin *et al.*, 2015) e não sobre a reversão dessa doença (Gurtu e Michelakis, 2015).

1.3. SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO NA HAP

Influenciando o sistema cardiovascular está o sistema nervoso autônomo, uma vez que, tanto a noradrenalina como a acetilcolina secretadas pelo sistema nervoso simpático (SNS) e parassimpático, respectivamente, modificam a função dos vasos pulmonares e o desempenho cardíaco. A ativação destes sistemas neuro-humorais, especialmente o SNS, desempenha um papel chave na progressão desfavorável da disfunção vascular e ventricular (Rendqvist *et al.*, 1997; Angelis *et al.*, 2014; Ameri *et al.*, 2016).

Ameri *et al.* (2016) descrevem que a ativação sustentada do SNS contribui para o remodelamento vascular, embora os mecanismos pelos quais isso acontece permaneçam mal caracterizados. Em referência ao remodelamento cardíaco, Ameri *et al.* (2016) acrescentam que a hiperativação do SNS sobre o VD, sobretudo pela ação da noradrenalina, leva à redução da expressão e sinalização intracelular do receptor beta-adrenérgico β_1 , bem como da recaptação da noradrenalina. Dessa forma, esta hiperatividade simpática a longo prazo produz efeitos deletérios e acelera a progressão da doença, através do remodelamento ventricular patológico e indução de morte celular (Triposkiadis *et al.*, 2009).

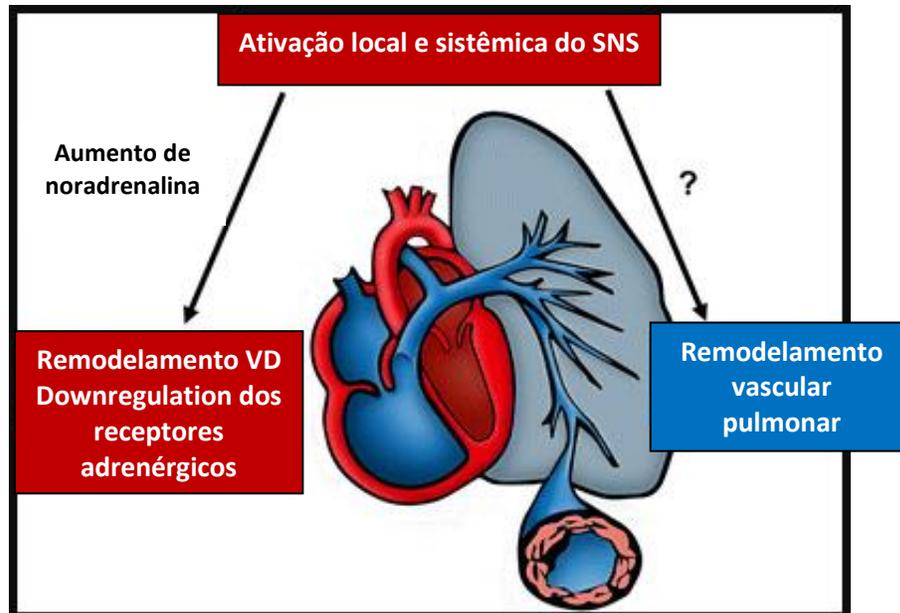


Figura 3: Sistema nervoso simpático na hipertensão arterial pulmonar.
(Retirado de Ameri *et al.*, 2016)

1.4. MECANISMOS DE MORTE CELULAR NAS DOENÇAS CARDÍACAS

1.4.1 Morte Celular

A renovação contínua das estruturas biológicas, asseguram que os componentes danificados do organismo sejam removidos e substituídos por novos sintetizados (Davani *et al.*, 2005). Quando irreversivelmente danificadas, as células doentes podem iniciar o processo de morte celular, aguda ou progressivo, sendo uma característica de diversas doenças cardíacas (Chiong *et al.*, 2011), incluindo a HAP (Thenappan *et al.*, 2018). Evidências demonstram que o músculo cardíaco contém células tronco multipotentes, que podem se diferenciar em miócitos maduros, especialmente em resposta à lesão (Davani *et al.*, 2005). Contudo, a substituição dos miócitos cardíacos é um processo incompleto e lento e, assim, são

denominadas células pós-mitóticas de longa duração (Terman e Brunk, 2005). Desta forma, a perda de cardiomiócitos leva o miocárdio a danos irreversíveis, sendo a morte celular o desfecho final do remodelamento cardíaco (Louis *et al.*, 2014). Assim, investigar ações que possam prevenir ou reduzir a ativação de vias de morte, são essenciais para prevenir a evolução da doença cardiovascular em direção à insuficiência cardíaca (IC) (Whelan *et al.*, 2010). A estimulação dos receptores adrenérgicos pela noradrenalina é um mediador crucial na desregulação do ciclo celular, sendo um dos principais mecanismos de ativação do transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) e da proteína p70 S6 kinase (p70 S6K), ambos levando à estimulação de síntese de proteínas e proliferação descontrolados (Kishore e Verma, 2012).

Durante esta progressão, os três tipos de morte celular são encontrados: apoptose, autofagia e necrose (Konstantinidis *et al.*, 2012). Contudo, sobre ação da noradrenalina, a morte celular dos cardiomiócitos segue geralmente a via autofágica (Aránguiz-Urroz *et al.*, 2011) e apoptótica (Louis *et al.*, 2014).

1.4.2. Autofagia

Autofagia é um processo de manutenção da homeostase celular, em que organelas não funcionais e proteínas danificadas ou modificadas são degradadas no lisossoma. Existem três tipos de autofagia: macro-autofagia (geralmente referido como autofagia), micro-autofagia e autofagia mediada por chaperonas. Na macro-autofagia, um autofagossoma se funde com o lisossoma para formar o autolisossoma e promover a degradação proteolítica dos componentes citosólicos. Na micro-autofagia, ao contrário, os componentes citosólicos são diretamente

absorvidos pelo próprio lisossoma através da invaginação da sua membrana. Já na autofagia mediada por chaperonas, as proteínas alvo são translocadas através da membrana lisossomal em um complexo com proteínas chaperonas, resultando na degradação (Glick *et al.*, 2010). Os produtos da degradação retornam para o citosol como macromoléculas, servindo para a síntese de novas estruturas e metabolismo (Baehrecke, 2005). Dessa forma, a autofagia não só medeia o controle de danos, mas promove eficiência energética através da geração de ATP (Glick *et al.*, 2010).

A autofagia é iniciada por uma cascata de sinalização envolvendo a fosforilação da proteína cinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) (Przyklenk *et al.*, 2012). A AMPK atua principalmente como um sensor do estado energético celular, ativando o processo autofágico, para que a degradação de componentes intracelulares (lipídeos e proteínas) sejam disponíveis para a geração de energia (Beauloye *et al.*, 2011). A AMPK pode atuar via ativação do complexo fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), proteína envolvida na formação dos autofagossomas (Kim *et al.*, 2013). Outro mecanismo promovido pela AMPK é a estimulação da autofagia através da inibição da proteína alvo da rapamicina nos mamíferos (mTOR). A mTOR é a principal controladora da ativação ou repressão da autofagia, coordenando o equilíbrio entre crescimento celular e morte, em resposta a condições fisiológicas e de estresse. A depleção de nutrientes ou a disponibilidade reduzida de fatores de crescimento inibem a atividade da mTOR, sendo estes eventos cruciais para indução da autofagia em células eucarióticas que necessitam de ajuste metabólico para sobreviver (Jung *et al.*, 2010). Sob condições ricas em nutrientes, a PI3K inibe a indução da autofagia através da ativação da mTOR e da fosforilação da proteína quinase B (Akt) (Lavandero *et al.*, 2015). Estas

principais vias que promovem a indução da morte celular convergem na clivagem e conversão do precursor citosólico LC3-I (proteína associada ao microtúbulo 1 de cadeia leve 3) em LC3-II. LC3-I é clivado para liberar uma glicina C-terminal, que conjugará com fosfolipídios logo após a indução da autofagia. Esta ação é essencial para extensão, curvatura e fechamento da membrana de isolamentos dos autofagossomas (He and Klionsky, 2009). Ao mesmo tempo, ocorre a degradação do LC3-II no lúmen auto lisossômico, e desta forma, seu turnover lisossomal reflete a atividade autofágica, e sua detecção, o método mais confiável para a monitorização deste processo (Tanida *et al.*, 2008).

No coração, a autofagia contribui para a manutenção da energia celular através da renovação fisiológica de organelas metabólicas essenciais, como as mitocôndrias e peroxissomas. Porém, em condições associadas a estados patológicos, como remodelamento cardíaco e hipertrofia, a autofagia torna-se desregulada (Rothermel e Hill, 2008; Aránguiz-Urroz *et al.*, 2011; Lavandero *et al.*, 2015). A falha desse processo frente a situações de estresse, além de desencadear a morte celular, contribui para o processo de transição de uma hipertrofia compensatória para um coração descompensado (Beauloye *et al.*, 2011). Sendo assim, uma janela de atividade autofágica ótima parece ser crítica para a manutenção da homeostase e da função cardiovascular (Lavandero *et al.*, 2015). Em resposta ao estresse da decorrente hiperativação neuro-humoral e/ou sobrecarga de pressão, o coração que inicialmente compensa sua função através de um processo hipertrófico adaptativo, sofre danos irreversíveis que resultam na dilatação e diminuição do desempenho. Esta descompensação está associada ao enfraquecimento das paredes ventriculares, em virtude da morte dos cardiomiócitos

por autofagia, com substituição por tecido fibroso (Zhu *et al.*, 2007). Segundo Zhu *et al.*, 2007, a autofagia elimina proteínas ou organelas danificadas, que poderiam ser tóxicas ou desencadear a morte por apoptose.

1.4.3. Apoptose

A apoptose é um processo biológico de morte celular geneticamente ordenado e regulado, no qual estímulos internos e externos à célula podem ativar proteínas intracelulares que permitem a célula cometer suicídio (Portt *et al.*, 2011). A apoptose leva à inativação e fragmentação da célula apoptótica, sem extravasar conteúdo intracelular tóxico para as células vizinhas, e, portanto, sem causar dano tecidual, o que resultaria em necrose, e levaria à uma reação inflamatória. Os fragmentos celulares são rapidamente fagocitados por macrófagos teciduais, permitindo que os componentes orgânicos sejam reciclados (Alberts *et al.*, 2002).

A apoptose pode ser controlada por duas distintas vias de sinalização, denominadas controle intrínseco e extrínseco. A via extrínseca consiste na indução externa, por meio de interações mediadas por receptores transmembrana. A via intrínseca ocorre por sinais intracelulares desencadeados por mitocôndrias, que atuam diretamente sobre alvos (Elmore, 2007). Igney and Krammer (2002) descrevem que pode haver influência de uma via sobre a outra, mas sabe-se que a via intrínseca é responsável pela maioria dos estímulos apoptóticos. Através da via intrínseca, os membros da família BCL2 são os principais reguladores da maquinaria mitocondrial de morte celular, controlando o potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) e sua permeabilidade pelo balanço entre proteínas pró-apoptóticas e anti-

apoptóticas, como a Bax (proteína X associada à Bcl-2) e a Bcl-2 (célula- β de linfoma 2), respectivamente. A Bax promove a abertura dos poros da membrana mitocondrial, permitindo a passagem da proteína citocromo c para o citoplasma com subsequente ativação das caspases (Chipuk *et al.*, 2010), estimulando o fenótipo hipertrófico mal adaptativo (Bernardo *et al.*, 2010). Já a Bcl-2, além de evitar a abertura dos poros da membrana das mitocôndrias evitando a cascata das caspases, também apresenta ação antioxidante por diminuir EROs (Susnow *et al.*, 2009; Chipuk *et al.*, 2010). Por meio da via extrínseca, decorrente da transdução de sinais extracelulares, a via das caspases é ativada no interior da célula. Desta forma, ambas as vias, intrínseca e extrínseca, culminam na ativação das caspases (família das proteases), consideradas indicadores de processos apoptóticos (Elmore, 2007). Em qualquer uma destas vias, as caspases iniciadoras clivam e ativam as caspases-3 e -7 (efetoras), que executam a apoptose por meio da clivagem de diferentes proteínas celulares (Algeciras-Schimnich *et al.*, 2002).

É sabido que a exposição crônica à noradrenalina é tóxica para os cardiomiócitos. A ativação dos receptores adrenérgicos β 1 e β 2 acoplados à proteína G G α s, via ação da noradrenalina, é responsável por estimular a apoptose em cardiomiócitos *in vitro* e *in vivo*, como resultado de modificações na expressão da Bcl-2. Quando acoplado à G α i, a ativação do receptor β 2 é responsável por ação anti-apoptótica (Shin *et al.*, 2014). Sabe-se que os cardiomiócitos expressam predominantemente receptores β 1, e dessa forma, a hiperativação destes receptores tem um papel importante não somente no remodelamento ventricular, mas também na indução da apoptose (Krishnamurthy *et al.*, 2007). Para Shin *et al.* (2014), o tratamento com bloqueadores β 1 aumenta a resistência dos

cardiomiócitos à morte celular, em resposta ao aumento da expressão da Bcl-2. Segundo Van Empel *et al.* (2005), considerando que o processo de apoptose tem duração de no máximo 24 h, e que a IC é uma condição que se manifesta com o passar dos anos, é aceito que a perda crônica de pequenos números de cardiomiócitos diariamente tenha graves consequências sobre a integridade do miocárdio.

1.5. MODELOS EXPERIMENTAIS

1.5.1 Estudo *in vivo*

Para melhor compreensão dos mecanismos patológicos da HAP e desenvolvimento de alternativas terapêuticas para prevenção e tratamento das manifestações clínicas, padrões experimentais utilizando animais têm sido propostos. O modelo mais utilizado para mimetizar a HAP é gerado pela administração de monocrotalina, um alcaloide advindo da planta *Crotalaria spectabilis* (Polonio *et al.*, 2012), pertencente à família das leguminosas (Figura 4). No Brasil, mais de quarenta espécies crescem abundantemente em plantações de grãos e em pastagens (Tokarnia *et al.*, 2000).



Figura 4: Foto da vagem, das sementes e das flores das espécies pertencentes ao gênero *Crotalaria*. (Retirada de Martinez *et al.*, 2013)

Em geral, para o modelo experimental da HAP, doses de monocrotalina (40 a 80 mg/kg) são administradas via intraperitoneal (i.p.) ou subcutânea em ratos Wistar (Gomez-Arroyo *et al.* 2012; Nogueira-Ferreira *et al.*, 2015). Sabe-se que a dose de 60 mg/kg (i.p) oferece facilidade e baixo custo para reproduzir o modelo (Gomez-Arroyo *et al.*, 2012). Além disso, as alterações cardiovasculares e pulmonares apresentadas são muito similares as dos pacientes com HAP (Yee *et al.*, 2000), bem como os parâmetros funcionais e bioquímicos (Brown *et al.*, 1998).

A sua transformação hepática é responsável pela sua toxicidade, sendo a dehidroxilação, realizada pelo complexo enzimático citocromo P-450, uma das reações químicas envolvidas com esse processo. Após a sua dehidroxilação, o metabólito ativo dehidromonocrotalina promove alterações estruturais e funcionais nos pulmões e na vascularização pulmonar (Shah *et al.*, 2005). O seu mecanismo de ação pulmonar ainda não está totalmente elucidado. No entanto, sabe-se que os glóbulos vermelhos do sangue aumentam significativamente o transporte dos metabólitos da monocrotalina do fígado para o pulmão, onde são liberados no endotélio pulmonar (Pan *et al.*, 1991). Então, por meio do desencadeamento de uma resposta inflamatória com resposta hipertrófica e hiperplásica das células musculares lisas (Gomez-Arroyo *et al.*, 2012) e desequilíbrio entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras, a monocrotalina torna-se uma potente indutora de lesão endotelial, levando ao surgimento progressivo da HAP (Meyrick *et al.*, 1980).

Dentro de horas após a exposição do animal à monocrotalina já se observa dano no endotélio vascular, sendo este o gatilho inicial para a vasculite pulmonar e o remodelamento pulmonar caracterizado pelo estreitamento e obliteração do lúmen

vascular. A partir da segunda semana da aplicação da monocrotalina, o aumento da PAPm e a hipertrofia do VD já são encontrados (West e Hemnes, 2011).

1.5.2 Estudo *in vitro*

Situações de estresse crônico, como a HAP, resultam em uma exposição prolongada do coração à catecolamina noradrenalina. A noradrenalina induz hipertrofia dos cardiomiócitos, passo inicial do remodelamento cardíaco, sendo um gatilho para a morte celular que representa o início da IC. Desta forma, o modelo *in vitro* de cardiomiócitos estimulados com noradrenalina é extremamente relevante e apropriado para avaliar o potencial de fármacos na cardioproteção contra danos patológicos causados pela hiperestimulação do SNS (Louis *et al.*, 2014).

Gupta *et al.* (2006) demonstraram que cardiomiócitos H9c2 expostos a 2 μM e 10 μM de noradrenalina (24 h) apresentaram aumento da viabilidade celular, indicando proliferação. Segundo Thakur *et al.* (2015), mioblastos cardíacos H9c2 tratados com 2 μM de noradrenalina (24 h) apresentam hipertrofia. Contudo, quando expostos a 100 μM de NA, pelo mesmo período, demonstram apoptose. Para Gao *et al.* (2015), doses de 5 μM – 50 μM de NA (36 h) estão relacionadas a apoptose das células H9c2.

1.6 BLOQUEADORES BETA-ADRENÉRGICOS

1.6.1. A utilização de Betabloqueadores na Hipertensão Pulmonar

Uma das razões pela qual as diretrizes atuais relutam em utilizar beta-bloqueadores para o tratamento da HAP é o temor de hipotensão sistêmica ou os

efeitos inotrópicos negativos, que estes são conhecidos por induzir (Galiè *et al.* 2015; Ameri *et al.*, 2016). Além disso, pacientes com HAP são altamente dependentes do ritmo cardíaco para aumentar seu débito cardíaco (Man e Handoko, 2015), podendo assim, ser intensamente afetados pela redução da frequência cardíaca, causada por esta classe de fármacos.

Ao analisar evidências experimentais, Ishikawa *et al.* (2009), em um modelo de HAP induzido por monocrotalina, encontraram uma atenuação na PAPm, uma diminuição na RVP e uma redução na hipertrofia ventricular direita, após tratamento com o betabloqueador arotinolol. Boogard *et al.* (2010) avaliaram os efeitos do bloqueio adrenérgico com carvedilol (bloqueador α_1 , β_1 e β_2) na circulação pulmonar e no coração direito na HAP experimental, modelo de monocrotalina. O tratamento com carvedilol resultou em uma diminuição da pós-carga do VD, aumento da função sistólica, diminuição da dilatação e aumento do débito cardíaco. Em estudo de HAP experimental, o tratamento com o betabloqueador bisoprolol apresentou-se eficaz em retardar a IC, através da melhora da contratilidade, redução da fibrose e inflamação do miocárdio (Man *et al.*, 2012). Okumura *et al.* (2015) demonstraram que o tratamento com carvedilol, em modelo de HAP em ratos Sprague-Dawley, reduziu o teor de colágeno cardíaco, expressão de fatores de crescimento e hipertrofia ventricular direita. Contudo, não foi eficaz na redução da pressão sistólica do ventrículo direito e desencadeou queda da frequência cardíaca. Já o betabloqueador nebulolol, em estudo de Perros *et al.* (2015), foi eficaz na atenuação da disfunção endotelial, através da atenuação da superexpressão de mediadores inflamatórios e do potente vasoconstritor ET-1.

1.6.2. Betabloqueador Bucindolol

Bucindolol é um betabloqueador altamente lipofílico, metabolizado pelo fígado pelas enzimas do citocromo P450 (Bristow, 2000), e que apresenta meia-vida de cerca de 8 h (Bristow, 2000). Denominado um bloqueador de terceira geração, atua nos receptores β_1 , β_2 e apresenta atividade antagonista α_1 adicional, contribuindo para um efeito vasodilatador (Tabela 1) (Batlouni e Albuquerque, 2000). Seu perfil de atividade neuro-hormonal é muito semelhante ao do carvedilol, mas diferem quanto às propriedades antioxidantes (Tabela 1) (Batlouni e Albuquerque, 2000). Além disso, o bucindolol apresenta propriedade simpatolítica, característica única em comparação a outros betabloqueadores (Tabela 1). Esta propriedade refere-se à capacidade deste fármaco em reduzir os níveis e o efeito da noradrenalina sistêmica (Black-Maier *et al.*, 2015). Sabe-se que o aumento dos níveis de noradrenalina plasmática está relacionado com pior desempenho cardíaco e com a gravidade da HAP (Cohn *et al.*, 1984).

Fármaco	Antagonismo em β_1	Antagonismo em β_2	Antagonismo em α_1	Redução de NA sistêmica	Ação antioxidante
Nebivolol	++++	+	0	0	0
Metoprolol	++++	++	0	0	0
Atenolol	++++	++	0	0	0
Bisoprolol	++++	+	0	0	0
Carvedilol	++++	++++	+++	0	+
Bucindolol	++++	++++	+	+++	0

Tabela 1: Comparação da ação dos principais betabloqueadores.

(Retirado e adaptado de Batlouni e Albuquerque, 2000; Black-Maier *et al.*, 2015)

O *Beta-blocker Evaluation of Survival Trial* (BEST) analisou o efeito do bucindolol no tratamento de pacientes com IC. Em pacientes com fibrilação atrial, o

tratamento com bucindolol foi associado ao controle da frequência cardíaca, reduções significativas no número e tempo de hospitalização e diminuição da mortalidade (Kao *et al.*, 2013). Segundo Eichhorn (1993), o bucindolol é bem tolerado em humanos com IC e produz melhoras no desempenho sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo, e redução da PAPm. Além disso, a tolerância ao exercício físico e o consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) não se modificam com o uso deste betabloqueador. Em relação ao coração, Eichhorn *et al.* (1990) descrevem que o bloqueio adrenérgico com bucindolol melhora a função contrátil do miocárdio, mantendo o consumo de oxigênio inalterado.

Em estudo de Pönicke *et al.* (2002), cardiomiócitos adultos de ventrículo de rato foram incubados com diferentes concentrações de noradrenalina, na presença de diferentes antagonistas adrenérgicos, por 16 h. Os autores demonstraram que, em baixas concentrações (até 10 nM), bucindolol aumentou a síntese proteica induzida por 1 μ M de noradrenalina em cardiomiócitos adultos. Contudo, quando acima de 10 nM, o bucindolol inibiu a síntese proteica induzida pela noradrenalina, sendo 10 μ M considerada a concentração ótima. Ao avaliar a ação do betabloqueador bucindolol (10 nM e 1 μ M) sobre os efeitos causados pela noradrenalina (10 μ M) em cardiomiócitos adultos, Pönicke *et al.* (2002) demonstram novamente que baixas doses (10 nM) se relacionam ao aumento da síntese proteica, sendo esta inibida pela dose de 1 μ M.

2. FORMULAÇÃO DO PROBLEMA

Estudo *in vivo*

O bucindolol atenua a disfunção endotelial e o remodelamento vascular pulmonar produzido pela administração de monocrotalina?

Estudo *in vitro*

O aumento dos níveis de noradrenalina está relacionado à hipertrofia dos cardiomiócitos, bem como ao desequilíbrio de vias de morte celular? Qual a ação do betabloqueador bucindolol sobre vias de sinalização para hipertrofia cardíaca? O bucindolol é capaz de modular a sinalização para vias de autofagia e apoptose induzidas pela noradrenalina?

3. HIPÓTESE

Estudo *in vivo*

Os animais com HAP submetidos ao tratamento com bucindolol terão a disfunção endotelial e o remodelamento vascular pulmonar atenuados, através de melhora no balanço redox e consequente atenuação do dano oxidativo pulmonar.

Estudo *in vitro*

A noradrenalina sinalizará para a hipertrofia dos cardiomiócitos, contribuirá para o aumento na produção de EROs e induzirá a morte celular por apoptose e autofagia. A administração de bucindolol reduzirá estes processos, protegendo as células cardíacas da hiperestimulação da noradrenalina e sua consequente ação, através da sua ação de bloqueio adrenérgico.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

No estudo *in vivo*, avaliar os efeitos do betabloqueador bucindolol na disfunção endotelial e no remodelamento vascular pulmonar, através da avaliação de parâmetros funcionais, estruturais e de estresse oxidativo no modelo experimental de HAP induzida por monocrotalina. Após, observar o impacto hiperestimulação simpática e do tratamento com bucindolol sobre a hipertrofia e performance do miocárdio nestes animais. No estudo *in vitro*, analisar a ação do bucindolol sobre vias de sinalização para sobrevivência/hipertrofia e morte celular, através da análise de parâmetros relativos ao estresse oxidativo e moleculares em cardiomiócitos submetidos ao modelo experimental de estresse, induzido por noradrenalina.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudo *in vivo*

- Analisar a histologia da artéria pulmonar através da realização da coloração de hematoxilina-eosina (HE) para verificação da espessura da artéria pulmonar dos diferentes grupos experimentais.
- Avaliar a influência do bucindolol sobre o imunoconteúdo das proteínas eNOS, ETAR e ETBR, em homogeneizado de pulmão.
- Verificar a influência do tratamento sobre a atividade e expressão das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona

peroxidase (GPx), bem como sobre o dano oxidativo a lipídios, em homogeneizado de pulmão.

- Determinar os níveis de nitrotirosina através da técnica de imunohistoquímica, na artéria pulmonar dos animais nos diferentes grupos experimentais.
- Quantificar a hipertrofia do VD, nos diferentes grupos experimentais.
- Verificar as modificações induzidas pela monocrotalina e pelo bucindolol através de ecocardiografia transtorácica, avaliando parâmetros de RVP e IPM.

Estudo *in vitro*

- Investigar o efeito do betabloqueador bucindolol sobre células cardíacas H9c2, na presença de diferentes concentrações do estímulo estressor noradrenalina, analisando sua resposta sobre a viabilidade celular.
- Avaliar os efeitos do bucindolol sobre as vias de hipertrofia/sobrevivência dos cardiomiócitos estimulados pela noradrenalina, através da quantificação do imunocorrelato das seguintes proteínas: p-STAT3, STAT3, PI3K, p-Akt, Akt, p-mTOR, mTOR, P70 S6K, p-AMPK e AMPK.
- Analisar o imunocorrelato dos marcadores de autofagia LC3B-I e LC3B-II, nos diferentes grupos experimentais.
- Avaliar os efeitos da noradrenalina e do bucindolol sobre a atividade da caspase 3/7 por citometria de fluxo.
- Determinar a influência do betabloqueador bucindolol sobre os níveis de morte celular, através da análise do iodeto de propídio por citometria de fluxo.

- Determinar a ação do bucindolol sobre as EROs por citometria de fluxo, bem como sobre a lipoperoxidação via imunocconteúdo da proteína 4-hidroxinonenal (4-HNE).

5. MATERIAIS E MÉTODOS DO ESTUDO *IN VIVO*

5.1. ANIMAIS

Foram utilizados 36 ratos Wistar machos, com peso de 120 ± 10 gramas. Os animais foram provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Durante o período do estudo, os animais foram alojados no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, localizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS. Os animais foram mantidos em caixas plásticas (15 x 32 x 39 cm), com quatro animais por caixa, sob condições padrão de biotério: ração comercial (Nuvilab CR-1) e água *ad libitum*, umidade controlada (70%), ciclo “claro-escuro” de 12 h e temperatura controlada (20 – 25 °C).

5.2. CÁLCULO AMOSTRAL

O cálculo do tamanho amostral foi efetuado através do programa *Sigma Plot 12.0*. No cálculo foram considerados probabilidade de erro $\alpha = 0,05$ e poder do teste estatístico de 0,95, sendo o parâmetro utilizado a RVP. O n calculado foi de 8 animais por grupo, totalizando 32 animais para quatro grupos. Considerando a estimativa de perda de 25 % dos animais no período de desencadeamento da doença (Souza-Rabbo *et al.*, 2008), foram adicionados 4 animais ao tamanho amostral (inseridos 2 animais em cada grupo que recebeu a monocrotalina), totalizando 36 animais.

5.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para o desenvolvimento desta pesquisa, quatro grupos experimentais foram estabelecidos:

Controle sem bucindolol (CTR): animais que receberam a administração de solução salina e receberam o tratamento com veículo (n = 8);

Controle bucindolol (CTR+BCD): animais que receberam a aplicação de solução salina e foram submetidos ao tratamento com bucindolol (n = 8);

Monocrotalina sem bucindolol (MCT): animais que receberam a administração de monocrotalina e receberam o tratamento com veículo (n = 10);

Monocrotalina bucindolol (MCT+BCD): animais que receberam a aplicação de monocrotalina e foram submetidos ao tratamento com bucindolol (n = 10).

5.4. BIOÉTICA COM OS ANIMAIS

Todos os procedimentos experimentais desenvolvidos no presente estudo estão de acordo com a Lei Arouca (Lei nº 11.794), com as Diretrizes para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos, de 2013, com as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA - 2013 (Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal) e com o “Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório” publicado pelo Instituto Nacional de Saúde (NIH Publication, 8th Edition, 2011). Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, através do **número de aprovação: 30484**.

5.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

5.5.1. Ambientação dos Animais

Os animais permaneceram 7 dias em ambientação, no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do ICBS da UFRGS. Após este período, a administração de monocrotalina foi efetuada.

5.5.2. Administração da Monocrotalina

Os animais receberam uma única injeção de monocrotalina (60 mg/kg – i.p.) (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EUA) ou solução salina 0,9 % (pH 7,4) no mesmo volume. A diluição da monocrotalina, sendo 60 mg para 1 mL de volume final, foi feita em 0,5 mL de HCl 1N. Após solubilizar, o pH foi ajustado até atingir 7,4 com a adição de NaOH 1N e, para complementar o volume final foi acrescentado NaCl 0,9 % (Farahmand *et al.*, 2004). Para um rato de 180 gramas, por exemplo, foi administrado 180 µL de solução, não alterando, portanto, a sua volemia (Rhoden e Rhoden, 2006). Após a indução da HAP, os animais foram pesados e acompanhados por 14 dias. Este procedimento foi considerado com grau de severidade moderado.

5.5.3. Administração do Betabloqueador Bucindolol

Após duas semanas da administração da monocrotalina, os animais foram submetidos ao tratamento com o betabloqueador bucindolol (2 mg/kg) (Santa Cruz

Biotechnology, CA, EUA), sendo a preparação adaptada de Baker *et al.*, 2011. Este foi administrado uma vez por dia, via injeção i.p., durante 7 dias. Para um animal de 250 gramas, para exemplificar, foi administrado 0,5 mL de solução. Segundo Rhoden e Rhoden (2006), quantidades tão elevadas quanto 10 mL / 100 g de peso corporal podem ser administrados via i.p.; deste modo, nos mantivemos bem inferior à margem de segurança com administração de volumes menores. Os animais que não pertenciam aos grupos que receberam bucindolol foram submetidos ao tratamento com veículo (1 % DMSO, 2 % Tween 20, 0,9 % NaCl) no mesmo volume. Este procedimento foi considerado com grau de severidade leve.

5.5.4. Eutanásia dos Animais

Aos 29 dias do protocolo experimental, os animais dos diferentes grupos experimentais foram anestesiados com quetamina (90 mg/kg - i.p.) e xilazina (10 mg/kg – i.p.), conforme o Guia de Anestesia e Analgesia para Ratos e Camundongos 2016 do CREAL / UFRGS, e submetidos à ecocardiografia. Posteriormente, os animais foram eutanasiados mediante decapitação em guilhotina manual. Os animais foram decapitados após sobre dose anestésica e em ambiente apropriado, isolado da sala de alojamento onde se encontravam os animais despertos, com higienização completa de todo o material entre a morte de um animal e outro, tendo o responsável pelo procedimento experiência na sua realização.

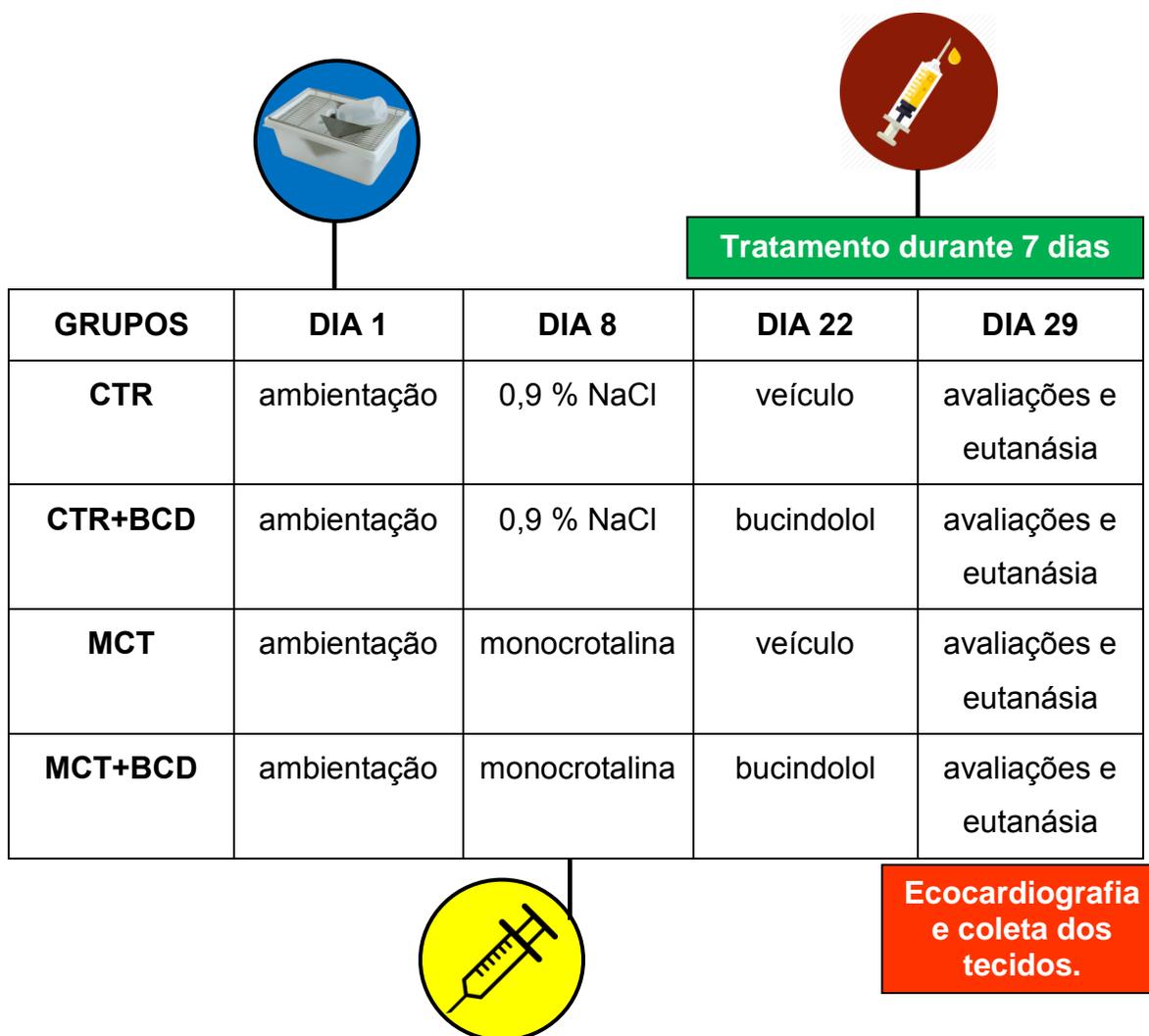


Figura 5: Desenho experimental do estudo *in vivo*.

5.6. ANÁLISES MORFOMÉTRICAS E FUNCIONAIS

5.6.1. Peso Corporal

Os animais foram pesados semanalmente, com o objetivo de verificar o efeito da doença e do tratamento sobre o ganho de massa corporal.

5.6.2. Ecocardiografia

As imagens ecocardiográficas foram obtidas no modo bidimensional e Doppler pulsado (Sistema de ultrassom HD7; Philips, Andover, MA, EUA) usando um transdutor S12-4 (Philips, Andover, MA, EUA). A RVP foi calculada pela relação entre o tempo de aceleração pelo tempo de ejeção através da artéria pulmonar (AT/ET). O IPM foi determinado utilizando a seguinte fórmula: $IPM = (\text{tempo de fechamento da valva tricúspide} - \text{tempo de ejeção através da artéria pulmonar}) / \text{tempo de ejeção pela artéria pulmonar}$ (Rudski *et al.*, 2010; Urboniene *et al.*, 2010).

5.6.3. Coleta dos Tecidos

Imediatamente após a eutanásia, o tórax dos animais foi aberto, o coração rapidamente retirado e colocado em solução KCl 1,15 % sobre o gelo. Com auxílio de material cirúrgico, tesouras e pinças, os átrios e ventrículos esquerdos (mais septos) foram separados e descartados, enquanto os ventrículos direitos foram coletados. Pulmões, artéria pulmonar e tibia direita também foram coletados. O peso do VD e o comprimento da tibia direita foram mensurados. O pulmão direito e o VD foram rapidamente identificados, congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80 °C para as análises posteriores. O pulmão esquerdo e as artérias pulmonares foram imersas em paraformaldeído 4 %, e destinados à avaliação histológica e de imunohistoquímica. Já a tibia, após pesada foi descartada, em lixo apropriado.

5.6.4. Avaliação da Hipertrofia Cardíaca

O índice de hipertrofia do VD foi calculado através do peso do VD / comprimento da tibia (Yin *et al.*, 1982).

5.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

5.7.1. Homogeneização do Pulmão

Para a realização das análises de estresse oxidativo, o pulmão foi homogeneizado durante 40 seg (Ultra-Turrax; Bosch, Atibaia, SP, Brasil) com KCl (1,15 % na quantidade de 5 mL / g de tecido) e 1 % de fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF) na concentração de 100 mmol / L em isopropanol. O PMSF é um inibidor de proteases, evitando a degradação das enzimas cuja atividade foi avaliada. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 20 min a 3000 rpm em centrífuga refrigerada a 4 °C (Modelo Mikro 220R; Hettich Zentrifugen) e os sobrenadantes armazenados em tubo tipo Eppendorff e congelados em freezer a -80 °C, para realização das medidas determinadas (Llesuy *et al.*,1985).

5.7.2. Quantificação de Proteínas e Concentração de Hemoglobina

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry *et al.* (1951), que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg / mL. A leitura foi efetuada em um espectrofotômetro de placa (Anthos

Zenyth 200, Biochrom; Holliston, MA, USA) a 625 nm. Os resultados foram expressos em mg de proteína / mL.

A determinação das concentrações de hemoglobina, a fim de inibir sua atividade oxidativa na mensuração da atividade da enzima GPx, foi realizada pela conversão da hemoglobina em cianometemoglobina usando reagente de Drabkin contra uma curva padrão, mensurada a 546 nm (espectrofotômetro Cary 1E; Varian, Victoria, AU), sendo os valores expressos em mg / mL (Drabkin e Austin, 1935).

5.7.3. Avaliação das Enzimas Antioxidantes e Lipoperoxidação

5.7.3.1. Superóxido dismutase (SOD)

A enzima SOD catalisa a reação de dois $O_2^{\cdot-}$, com a conseqüente formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Assim, a determinação da SOD se baseia na inibição da reação deste radical com o pirogalol. O $O_2^{\cdot-}$ é gerado pela autooxidação do pirogalol em meio básico. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo $O_2^{\cdot-}$ com o sistema de detecção. A atividade da SOD foi determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado. No ensaio, a oxidação máxima do pirogalol foi determinada, possibilitando assim calcular a percentagem de inibição causada pela SOD das amostras. A reação leva à formação de um produto colorido detectado espectrofotometricamente a 420 nm (Marklund, 1985). Para esse ensaio, utilizou-se homogeneizado de pulmão na presença de tampão Tris Base 50 mM e EDTA 1mM, adicionando-se Catalase 30 μ M (Catalase – aqueous suspension 10,000-40,000 units, Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EUA) e pirogalol 24 mmol / L (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EUA). O espectrofotômetro utilizado foi Cary

1E (Varian, Victoria, AU), e os resultados da atividade desta enzima foram expressos em U SOD / mg de proteína.

5.7.3.2. Catalase (CAT)

A enzima CAT é uma hemoproteína que catalisa a decomposição do H_2O_2 à H_2O . Desta forma, o consumo do H_2O_2 pode ser utilizado como uma medida de atividade desta enzima. O ensaio consiste em mensurar a diminuição da absorvância no comprimento de onda de 240 nm. Devido à alta energia do comprimento de onda no qual as medidas são realizadas, utilizam-se cubetas de quartzo. Para a realização deste ensaio foram utilizados uma solução tampão fosfato a 50 mM (pH = 7,4) e H_2O_2 0,3 M. Na cubeta, foram adicionados 955 μ L do tampão fosfato e 10 μ L de amostra. À cubeta foi adicionado H_2O_2 0,3 M e feito o monitoramento da diminuição da absorvância. O espectrofotômetro utilizado foi Cary 1E (Varian, Victoria, AU), e os resultados foram expressos em nmol / min / mg de proteína (Boveris e Chance, 1973).

5.7.3.3. Glutathione peroxidase (GPx)

A enzima GPx catalisa a reação de peróxidos com glutathione reduzida (GSH), formando glutathione oxidada (GSSG) e o produto da redução do peróxido. Fisiologicamente, a GPx atua em conjunto com a enzima glutathione redutase (GR), a qual catalisa a redução da GSSG, usando NADPH como cofator. Assim, a atividade da GPx pode ser monitorada pela taxa de oxidação do NADPH a 340 nm

na presença de GSH e GR, utilizando-se azida sódica para inibição da enzima CAT e hidroperóxido de tert-butil como iniciador. Para o ensaio, foi utilizado homogeneizado de pulmão na presença de tampão fosfato 143 mM EDTA 4 mM, adicionando-se NADPH 0,24 mM (N1630, Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EUA), azida 25 mM (S8032, Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EUA), GSH 20 mM (G4251, Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EUA) e GR (G3664 10 U / ml, Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EUA). O espectrofotômetro utilizado foi Cary 1E (Varian, Victoria, AU), e a atividade da GPx foi expressa como nmol / min / mg de proteína (Flohé e Gunzler, 1984).

5.7.3.4. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

A peroxidação lipídica foi avaliada através da mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), descrita por Ohkawa *et al.* (1979). Os homogeneizados foram misturados com TCA 20 % [m/v], e em seguida realizou-se a centrifugação a 3000 rpm durante 5 min. O ácido tiobarbitúrico (0,67 % [m/v]) foi adicionado a uma alíquota do sobrenadante e a mistura foi aquecida num banho com água fervente durante 15 min. A absorbância foi mensurada em um espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200, Biochrom; Holliston, MA, USA) a um comprimento de onda de 535 nm. Os resultados foram expressos em nmol de TBARS / mg de proteína, utilizando o coeficiente de extinção do malondialdeído ($156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

5.8 ANÁLISES DA EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN BLOT

Os pulmões foram homogeneizados em um homogeneizador (Ultra-Turrax; Bosch, Atibaia, SP, Brasil) utilizando-se um tampão de lise celular (10x) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EUA) diluído em água Mili-Q e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF). A suspensão foi centrifugada a 8000 x g, durante 15 min, a 4°C. Os sobrenadantes foram utilizados para este ensaio, onde a concentração de proteínas foi quantificada (item 5.7.2) e utilizada para normalização das amostras. Cinquenta µg de proteína foram utilizados para uma eletroforese unidimensional em gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) 10 % (Araujo *et al.*, 2006; Laemmli, 1970). As proteínas separadas durante a eletroforese foram transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF), da empresa Bio-Rad (Bio-Rad, São Paulo, SP, Brasil). A coloração de Ponceau foi realizada e a membrana foi bloqueada com leite desnatado a 5% em solução Tris (20 mmol / L Tris, 137 mmol / L NaCl) por 1 h em temperatura ambiente, e depois incubados durante a noite com os seguintes anticorpos primários IgG policlonais: ETAR (69 KDa), ETBR (50 kDa), eNOS (140 kDa), SOD-1 (23 kDa), CAT (64 kDa) e GPx (22 kDa) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA ou Abcam, Cambridge, MA, EUA). A ligação dos anticorpos primários foi detectada com anticorpos secundários conjugados à peroxidase de rabanete. As membranas foram reveladas a partir da utilização de reagentes para detecção por quimiluminescência. As reações foram detectadas por autorradiografia (Hyperfilm ECL; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e analisadas pelo software ImageJ (Wayne Rasband, Research Services Branch, NIH, Bethesda, MD, EUA). A densidade óptica de cada amostra foi normalizada de acordo com o imunoconteúdo

das proteínas GAPDH (40 kDa) ou α -actina (100 kDa) (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA).

6. MATERIAIS E MÉTODOS DO ESTUDO *IN VITRO*

Os experimentos *in vitro* foram realizados durante o período de doutorado-sanduíche (15 de dezembro de 2016 a 01 de junho de 2017), na Lakehead University, Northern Ontario School of Medicine (Thunder Bay, Ontário, Canadá), sob supervisão da Dra. Neelam Khaper. Projeto: 001/2013 - CAPES/DFAIT / Brazil-Canada Cooperation to Advance Studies on Oxidative Stress and Antioxidant Strategies in Cardiovascular Disease.

6.1. CULTURA CELULAR DE LINHAGEM

Mioblastos cardíacos de linhagem H9c2 (*Rattus norvegicus*) (American Type Culture Collection Cells Line, Manassas, VA, EUA) foram cultivados em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino (FBS) (HyClone Laboratories, Pittsburgh, PA, USA) e 1 % de antibiótico-antimicótico (100 X) (penicilina 10.000 U / mL, estreptomicina 10.000 μ g / mL - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA e 25 μ g / mL e anfotericina B - Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), e incubados a 37 °C, 5 % CO₂ e 100 % de umidade. Para a manutenção do cultivo da linhagem celular, o meio de cultura foi substituído a cada 2 a 3 dias e as novas passagens

celulares foram realizadas quando as células atingiram a confluência de 75 - 80 %, objetivando a manutenção das características mioblásticas.

Para os protocolos experimentais, as células foram semeadas nas seguintes quantidades: 1×10^4 células/poço para o ensaio de viabilidade celular por MTT; 1×10^5 células / mL para as análises no citômetro de fluxo e 1×10^6 células / frasco de 75 cm² para as análises por Western Blot. Uma vez semeadas, as células foram deixadas em repouso durante 24 h para aderirem à placa.

6.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para o desenvolvimento desta pesquisa, quatro grupos experimentais foram estabelecidos:

Controle (CTL): Células H9c2 foram mantidas em meio regular de incubação (DMEM).

Controle+Bucindolol (CTL+BCD): Células H9c2 foram mantidas em meio regular de incubação e tratadas com 10 µM de bucindolol.

Noradrenalina (NE): Células H9c2 foram mantidas em incubação com 10 µM de noradrenalina e não receberam tratamento.

Noradrenalina+Bucindolol (NE+BCD): Células H9c2 foram mantidas em incubação com 10 µM de noradrenalina e 10 µM de bucindolol.

6.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

6.3.1. Incubação com Noradrenalina

A concentração da noradrenalina foi determinada através do ensaio de viabilidade celular (item 6.4.1), onde as células H9c2 foram expostas a diferentes concentrações deste neurotransmissor (2 μ M, 5 μ M e 10 μ M) em dois diferentes tempos (24 h e 36 h). Com base nos resultados encontrados, a concentração de 10 μ M (durante 24 h) foi utilizada para os demais experimentos.

A noradrenalina foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e sua diluição em 0,5 M HCl (0,03 %) se deu conforme orientações do fabricante. A incubação foi realizada com meio de cultura livre de FBS e antibiótico-antimicótico.

6.3.2. Tratamento com o Betabloqueador Bucindolol

Após 24 h de incubação com noradrenalina, as células H9c2 foram submetidos ao tratamento por 8 h com o betabloqueador bucindolol (10 μ M) (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), sendo a preparação em 0,010 % de DMSO (Dimethyl Sulfoxide; Fisher Scientific, Ottawa, ON, CA) de acordo com as orientações do fabricante. A incubação foi realizada com meio de cultura livre de soro fetal bovino e antibiótico-antimicótico. Ambas diluições, noradrenalina e bucindolol, não interferiram no pH do meio. Segundo Pönicke *et al.* (2002), em concentrações acima de 1 μ M (de 1 μ M e 10 μ M) bucindolol é capaz de inibir a indução de síntese proteica causada pela noradrenalina, sendo 10 μ M a concentração ideal deste betabloqueador.

Tempo e concentração da incubação das células H9c2		
GRUPOS	24 HORAS	8 HORAS
Controle (CTL)	DMEM	DMEM
Controle+Bucindolol (CTL+BCD)	DMEM	bucindolol (10 μ M)
Noradrenalina (NE)	noradrenalina (10 μ M)	DMEM
Noradrenalina+Bucindolol (NE+BCD)	noradrenalina (10 μ M)	bucindolol (10 μ M)

Figura 6: Desenho experimental do estudo *in vitro*.

6.4. ANÁLISES MOLECULARES

6.4.1. Avaliação da Proliferação/Viabilidade Celular

A proliferação/viabilidade das células cardíacas H9c2 foi determinada pelo ensaio do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio]). Para esta técnica, as células foram semeadas em placas de 96 poços (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA) e, após a aderência na placa, foi iniciado o tratamento dos grupos experimentais. Após 24 h de incubação com noradrenalina e 4 h de incubação com bucindolol, a solução de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi adicionada em cada poço (concentração final 10 % (v/v)), e incubada por mais 4 h a 37°C. O mesmo ocorreu após 36 h de incubação com noradrenalina. Durante este período, o reagente MTT foi convertido em cristais de formazan de cor púrpura, de acordo com a atividade metabólica das células. Ao final do tratamento, as soluções foram aspiradas cuidadosamente e foi adicionado DMSO em cada poço,

para dissolver os cristais formados pela reação. Após 10 min de incubação em um agitador The Belly Dancer (Stovall Life Science, Greensboro, NC, EUA), a absorbância foi mensurada espectrofotometricamente nos comprimentos de onda 490 nm e 650 nm em leitora PowerWave Spectrophotometer (Biotek, Winooski, Vermont, EUA). O delta entre as leituras foi expresso como porcentagem do controle (Bryan *et al.*, 2011).

6.4.2. Análise da Expressão Proteica por Western Blot

A técnica de Western Blot foi utilizada para analisar o imunoconteúdo de diferentes proteínas. Para esta técnica, as células foram plaqueadas em frascos de cultura de 75 cm² (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA). As células H9c2 foram homogeneizadas a 30 Hz durante 3 min (TissueLyser Qiagen; Redwood, CA, EUA) com tampão de lise PathScan (25 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton, 20 mM NaF, 1mM Na₃VO₄) contendo coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os detritos celulares foram removidos por centrifugação a 8.000 g durante 10 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram utilizados para o ensaio e a concentração de proteína foi quantificada utilizando o kit de ensaio de proteínas DC (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, CA). Trinta µg de proteína foram aquecidos a 95°C por 5 min em tampão de carregamento e submetidos à eletroforese em gel de SDS-Page (7 – 15 % de acordo com o tamanho das proteínas de interesse), e transferidos por eletroforese para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, CA). A membrana foi bloqueada com leite desnatado a 5 % em solução salina Tris (Tris 20 mM, NaCl 137

mM) por 1 h em temperatura ambiente, e incubada a 4 °C com os seguintes anticorpos primários: 4-HNE, p-Akt, Akt, p-AMPK α , AMPK α , p-mTOR, mTOR, LC3BI/II, p70 S6 kinase, PI3 kinase p85- α (pTyr607), p-STAT3, STAT3. Todos os anticorpos foram adquiridos da empresa Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, EUA), exceto: 4-HNE (Abcam, Cambridge, MA, EUA), Bax (Santa Cruz Biotecnologia, Santa Cruz, CA, EUA) e PI3K (Millipore, Bedford, MA, EUA). Os anticorpos primários foram detectados com anticorpos secundários conjugados com peroxidase de rabanete, e foram normalizados para β -actinina (43 kDa) (Santa Cruz Biotecnologia, Santa Cruz, CA, EUA). A reação de quimiluminescência foi detectada pelo Sistema ChemiDoc XRS, utilizando o software Quantity One versão 4.6.5 (Laboratórios Bio-Rad, Mississauga, ON, CA), que foram analisados pelo software ImageJ (Wayne Rasband, Research Services Branch, NIH, Bethesda, MD, EUA).

6.4.3. Atividade da Caspase-3/7 via Citometria de Fluxo

Para esta técnica, as células foram plaqueadas em frascos de cultura de 25 cm² (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA). A apoptose das células H9c2 foi mensurada pela presença de caspase-3/7 ativa, detectada por citometria de fluxo (FACSCalibur Flow Cytometer; BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) utilizando o kit CaspaTag Caspase-3/7 In Situ Assay (Chemicon International, Temecula, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Células positivas para caspase-3/7 foram avaliadas com base em sua fluorescência após a incubação com o reagente Inibidor Fluorescente de Caspases (FLICA) (Bryan *et al.*, 2011). Dez mil

eventos foram adquiridos e os dados foram expressos como intensidade de fluorescência na área M2 do histograma, como sugerido pelo fabricante.

6.4.4. Análise da Morte Celular por Iodeto de Propídio via Citometria de Fluxo

Para esta técnica, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA). A morte celular foi avaliada após a incubação de células H9c2 com solução de iodeto de propídio (PI) (250 µg / mL) (Millipore, Bedford, MA, EUA) por 10 min sob condições padrão de incubação. O PI é impermeável à membrana em células vivas, mas se liga ao DNA de células mortas devido à perda da integridade da membrana celular, causando aumento da fluorescência. Para esta análise, a porcentagem de células PI positivas foi determinada usando um citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) (10.000 eventos) (Queiroz *et. al.*, 2014).

6.4.5. Espécies Reativas de Oxigênio via Citometria de Fluxo

Para esta técnica, as células foram plaqueadas em frascos de cultura de 25 cm² (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA). A quantificação das EROs foi realizada após a incubação das células cardíacas H9c2 com CM-H₂DCFDA (diacetato de 5-[e-6]-clorometil-2',7'-diclorodi-hidrofluoresceína, éster de acetila) (Molecular Probes; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) durante 30 minutos, sob condições de incubação padrão. Este composto, após a oxidação celular, torna-se fluorescente, possibilitando sua mensuração por citometria de fluxo. Para a análise,

foi utilizado o canal FL1-H (10.000 eventos) de um FACSCalibur Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), suportado pelo software CellQuest Pro (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) (Bryan *et al.*, 2011). O resultado foi expresso como média \pm desvio padrão.

7. BIOSSEGURANÇA E DESCARTE DE ANIMAIS E RESÍDUOS

Durante a execução da metodologia descrita, os pesquisadores e bolsistas envolvidos utilizaram equipamentos de proteção individual (EPIs) tais como: luvas, máscaras, jalecos e óculos de proteção, se necessário. Além destes cuidados básicos, o preparo de algumas soluções ocorreu dentro da capela de exaustão quando necessário. O descarte de resíduos não tóxicos ocorreu no sistema de esgoto comum e os demais resíduos foram encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para procedimento correto de eliminação. Os resíduos biológicos foram descartados no lixo de cor branca. As carcaças dos animais mortos e os demais resíduos biológicos foram acondicionados em sacos brancos, identificados e encaminhados para uma empresa terceirizada responsável pelo serviço de coleta de materiais biológicos.

8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Sigma Plot (Versão 12.0; Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA). Os dados foram submetidos à avaliação da normalidade através do teste de Shapiro-Wilk. A análise

temporal do peso corporal dos animais foi realizada através de ANOVA de 2 vias para medidas repetidas. O ensaio MTT foi analisado por meio do teste ANOVA de 1 via, e os demais resultados por ANOVA de 2 vias. Em todas as análises estatísticas, o pós-teste utilizado foi Student-Newman-Keuls. A correlação entre as variáveis foi calculada usando o Coeficiente de Pearson. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0.05$, e os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. As variáveis categóricas foram analisadas descritivamente, e são apresentadas como frequência relativa. O n obtido para cada análise é indicado nas figuras e tabelas de forma individual.

9. RESULTADOS

Os resultados estão expressos em forma de artigo (em anexo):

Artigo 1 (publicado):

Lima-Seolin, B. G. de *et al.* (2018). Bucindolol attenuates the vascular remodeling of pulmonary arteries by modulating the expression of the endothelin-1 A receptor in rats with pulmonary arterial hypertension. ***Biomedicine and Pharmacotherapy*** 99:704-714. doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.127.

Artigo 2 (submetido):

Bucindolol attenuates cardiac remodeling by modulating oxidative stress in H9c2 cardiac cells exposed to norepinephrine.

10. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou pela primeira vez que o uso do betabloqueador bucindolol apresenta efeitos protetores tanto sobre a vasculatura pulmonar, no modelo experimental de HAP induzida por monocrotalina (1º estudo – *in vivo*), quanto sobre células cardíacas H9c2 submetidas à exposição prolongada da noradrenalina (2º estudo – *in vitro*).

É sabido que em situações em que há disfunção endotelial com subsequente aumento da pós-carga ao VD, como ocorre na HAP, a ativação aguda do SNS ocorre como uma resposta adaptativa com a finalidade de restaurar ou manter o débito cardíaco, assim como manter a homeostase vascular (Angelis *et al.*, 2004). A longo prazo, a ativação do SNS acelera a progressão da doença através da sinalização para proliferação endotelial e da musculatura lisa (Rubin, 2015), da vasoconstrição (Triposkiadis *et al.*, 2009), da estimulação da expressão de fatores de transcrição associados à síntese de proteínas nos miócitos (Remme, 2003) e da indução a morte celular por autofagia (Nakaoka *et al.*, 2015) e apoptose (Shin *et al.*, 2014). Assim, a hiperatividade simpática é o ponto-chave de ambos experimentos, *in vivo e in vitro*. Atualmente, o uso de betabloqueadores para o tratamento da HAP é controverso (Rubin, 2015; Galiè *et al.*, 2016), mas este parece ser um alvo promissor para a terapia da doença (Perros *et al.*, 2015; Rubin, 2015).

O estudo *in vivo* foi desenvolvido com o objetivo de analisar os efeitos do betabloqueador bucindolol na disfunção endotelial e no remodelamento vascular pulmonar no modelo experimental de HAP induzida por monocrotalina.

É sabido que a monocrotalina promove um dano às artérias e arteríolas pulmonares, e as consequências desse processo são a produção prejudicada do NO e aumentada da ET-1 (Tuder *et al.*, 2013). No presente estudo, a redução na produção de NO foi inferida a partir da menor expressão da enzima eNOS no pulmão dos animais com HAP (grupos MCT e MCT+BCD), enzima esta que catalisa a síntese do NO no endotélio vascular. Nosso resultado está de acordo com Varshney *et al.* (2016), que refere redução na expressão e na atividade da eNOS nos pulmões de ratos tratados com monocrotalina. A ET-1, potente vasoconstritor, é conhecida por reduzir a biodisponibilidade de NO, através da modulação da expressão da eNOS (Chen *et al.*, 2003). Além disso, seus receptores, ETAR e ETBR, têm um papel-chave na progressão da HAP. No nosso estudo, o ETAR, receptor que medeia a vasoconstrição, teve sua expressão aumentada no tecido pulmonar do grupo MCT. Por outro lado, foi encontrada menor expressão de ETBR, receptor associado ao *clearance* da ET-1 e à vasodilatação. Esses resultados sugerem aumento de ET-1 circulante no tecido pulmonar desses animais (Fukuroda *et al.*, 1994) e, conseqüentemente, maior estímulo para a proliferação da musculatura lisa (Zamora *et al.*, 1993) e ação inflamatória local (Siti *et al.*, 2015). O aumento da razão ETAR / ETBR, encontrado nos animais monocrotalina (MCT e MCT+BCD), está igualmente relacionado ao remodelamento vascular e conseqüente aumento da RVP (Kuc *et al.*, 2014). De fato, foi observado um aumento significativo na espessura da parede da artéria pulmonar e RVP destes animais. Contudo, o bucindolol foi capaz de atenuar esses efeitos, possivelmente através da modulação do ETAR e conseqüentemente do aumento da razão ETAR / ETBR. Sugere-se que esse possa ser o mecanismo pelo qual o bucindolol reduziu a PAPm

em ratos com HAP, dado que foi previamente demonstrado pelo nosso grupo (Lima-Seolin *et al.*, 2017). Além disso, evidências experimentais indicam que a ET-1 também é capaz de estimular o SNS pela ativação do ETAR (Nakamura *et al.*, 1999), podendo ser resultado da modulação da liberação das catecolaminas (ambas da medula suprarrenal e terminais nervosos simpáticos) (Mortensen *et al.*, 2001).

Na HAP, níveis aumentados de ET-1 e diminuídos de NO também estão associados a elevados níveis de $O_2^{\bullet-}$ na artéria pulmonar, acarretando a perda do equilíbrio redox (Wedgwood *et al.*, 2001). Entre os mecanismos de defesa antioxidante que metabolizam o $O_2^{\bullet-}$ está a enzima SOD (Poljsak, 2011), cuja atividade foi aumentada nos animais que receberam a monocrotalina (MCT e MCT+BCD). Um aumento na atividade da SOD sugere um aumento do produto da reação de dismutação, o H_2O_2 , que tem seu acúmulo impedido pelas enzimas GPx e CAT (Murphy *et al.*, 2011). Na avaliação dessas enzimas, foi encontrado um aumento significativo apenas na atividade da GPx nos animais monocrotalina (MCT e MCT+BCD). Sabe-se que a enzima GPx é estimulada na presença de estresse oxidativo leve (Lushchak, 2014). Sendo assim, nesta janela temporal de 21 dias, não podemos afirmar que houve estresse oxidativo pulmonar, uma vez que as defesas enzimáticas também estavam elevadas. Corroborando com esta afirmação está a avaliação da lipoperoxidação, a qual não foi alterada nos animais com HAP. O tratamento com bucindolol não foi eficaz em modificar este quadro. Contudo, o bucindolol reduziu a produção de peroxinitrito vascular, inferida pela marcação com nitrotirosina. O peroxinitrito é um produto da reação do NO com o $O_2^{\bullet-}$, sendo este um oxidante altamente instável capaz de ativar fatores de crescimento vascular

(Platt *et al.*, 2005). Dessa forma, poderia ser este mais um fator contribuinte para a redução na RVP ocasionada pelo betabloqueador bucindolol, sugerindo uma redução da pós-carga ao VD.

Um índice que está relacionado com o esforço que o miocárdio exerce para manter sua função de bomba em situações de elevada pós-carga é o IPM (Kakouros *et al.*, 2011). Neste trabalho, os animais do grupo MCT apresentaram valores superiores no IPM quando comparados aos MCT+BCD. Leichsenring-Silva *et al.* (2011) observaram uma correlação positiva entre o aumento da RVP na HAP e o aumento do esforço do miocárdio. Ao analisarmos nossos resultados, podemos inferir que os animais do grupo MCT se encontravam em um estado funcional descompensado. Comparativamente ao grupo MCT, os animais do grupo MCT+BCD apresentaram um IPM reduzido, indicando um menor esforço do miocárdio.

Os resultados observados no estudo *in vivo* desta tese serviram para elucidar os mecanismos envolvidos na redução da PAPm com o tratamento com bucindolol, observados em estudo prévio de nosso grupo (Lima-Seolin *et al.*, 2017). Neste mesmo estudo, o bucindolol promoveu melhoras em vários parâmetros funcionais do VD dos animais com HAP, sendo a melhora do balanço autonômico um dos mecanismos sugeridos (Lima-Seolin *et al.*, 2017). Ainda nesse estudo, os efeitos benéficos do bucindolol se estenderam para a redução da morte celular por necrose do miocárdio, a qual foi encontrada reduzida em 17 % nos animais MCT+BCD em comparação aos animais MCT. É sabido que o aumento na circulação de catecolaminas, como resultado do aumento da atividade do SNS, é responsável por efeitos cardiopéxicos que induzem a morte celular (Adameova *et al.*, 2009). Assim,

o estudo *in vitro* foi desenvolvido com o objetivo de analisar as vias de sinalização para sobrevivência e morte celular, via autofágica e apoptótica, em células cardíacas expostas à noradrenalina (10 μ M por 24 h) que receberam, ou não, o tratamento com bucindolol (10 μ M por 8 h).

É sabido que a noradrenalina promove proliferação celular e hipertrofia cardíaca mal adaptativa (Zhang *et al.*, 2016), sendo que no estudo *in vitro* desta tese, foram avaliadas algumas proteínas envolvidas neste processo. Foi observado que o bucindolol reduziu a expressão do fator de transcrição STAT3 e da via de sinalização PI3K / Akt, sugerindo que este tratamento pode atuar diretamente no miocárdio. Estes dados corroboram o estudo de Shin *et al.*, 2014, o qual demonstra que a redução na expressão destas proteínas atenua o remodelamento cardíaco patológico após injúria. Quando ativada pela Akt, a mTOR fosforila a p70 S6K, que desempenha um papel fundamental na estimulação da síntese proteica no coração (Kishore e Verma, 2012). Em nosso estudo, encontramos não só um aumento na expressão da STAT3 e atividade da PI3K e Akt, mas também um aumento na atividade da mTOR e p70 S6K, evidenciando hipertrofia cardíaca no grupo NE. O tratamento com bucindolol resultou numa diminuição da atividade / expressão destes marcadores de hipertrofia. A via de sinalização PI3K / Akt / mTOR também tem um papel importante na regulação da autofagia e apoptose (Aoyagi e Matsui, 2011).

A autofagia é o processo em que organelas não funcionais e proteínas danificadas ou modificadas são degradadas, servindo para o metabolismo e para síntese de novas estruturas (Jung *et al.*, 2010). No presente estudo, observou-se a ativação do processo autofágico através da avaliação da via de sinalização AMPK

/ mTOR, e do aumento da razão LC3-II / LC3-I, a qual está relacionada com a formação dos autofagossomas (He *et al.*, 2009). O aumento da autofagia foi evidenciado em ambos os grupos noradrenalina (NE e NE+BCD), sendo este ainda mais pronunciado no grupo NE+BCD. Sugere-se que esse resultado seja citoprotetor contra os efeitos deletérios da hiperatividade simpática persistente, já que este processo contribui para a eliminação de células danificadas e proteínas potencialmente tóxicas (Jung *et al.*, 2010), as quais poderiam contribuir para o aumento da sinalização para apoptose nos cardiomiócitos (Jung *et al.*, 2010; Nakaoka *et al.*, 2015).

A apoptose é um processo de morte celular ordenado e regulado, no qual estímulos podem ativar proteínas intracelulares que permitem à célula cometer suicídio (Portt *et al.*, 2011). Em relação à apoptose, observou-se, no grupo NE+BCD em relação ao grupo NE, uma diminuição significativa da ativação da caspase 3/7, enzimas que executam a apoptose por meio da clivagem de diferentes proteínas celulares (Algeciras-Schimnich *et al.*, 2002). Estes achados apontam para um efeito anti-apoptótico exercido pelo bucindolol, o qual é reforçado pelos resultados obtidos na mensuração da morte celular via PI, sendo que o betabloqueador reduziu significativamente o número de células mortas no grupo NE+BCD em comparação ao grupo NE.

O direcionamento de vias para a sobrevivência ou para a morte celular é dependente da concentração de EROs, sendo que esta está envolvida na ativação simpática (Oyama *et al.*, 2009). Em um artigo recente, Saleen e Goswami *et al.* (2017) demonstraram que a ativação de receptores adrenérgicos cardíacos pela noradrenalina também co-estimula a geração de Nox2, cujo principal produto é o

O₂⁻. Nossos resultados sugerem que um dos mecanismos iniciais pelos quais a noradrenalina e o bucindolol atuam é através de modificações na geração de EROs, responsáveis pela oxidação de macromoléculas. Um dos principais efeitos do aumento de EROS é a peroxidação lipídica (Gaschler e Stockwel, 2017), sendo o 4-HNE seu biomarcador mais importante. Este produto causa alterações na sinalização celular e induz apoptose pela ativação das caspases (Choudhary *et al.*, 2002). No grupo NE+BCD, houve uma diminuição bem pronunciada na formação de EROs e de 4-HNE, em comparação com ao grupo NE, reforçando sua ação cardioprotetora.

A literatura não demonstra qualquer efeito antioxidante do betabloqueador bucindolol. Sugerimos que as diferenças entre os resultados de estresse oxidativo *in vivo* e *in vitro*, possam se dar devido aos distintos protocolos experimentais e tecidos analisados. Possivelmente, o bucindolol possa não apresentar ação antioxidante direta, mas sim, ter a capacidade de estimular a transcrição dos genes de proteínas antioxidantes, aumentando a reserva de antioxidantes endógenos. Conseqüentemente, este fármaco favorece o combate contra moléculas pró-oxidantes importantes, envolvidas na patogênese de doenças cardiovasculares com hiperatividade simpática. Ressalta-se que os benefícios do betabloqueador bucindolol em um modelo de HAP induzida por monocrotalina, assim como sobre as ações da noradrenalina em cultura de células, obtidos nesta tese são demonstrados pela primeira vez na literatura.

Um ponto importante a ser mencionado é que uma das razões pela qual as diretrizes atuais relutam em utilizar inibidores neuro-hormonais para o tratamento da HAP é a broncoconstrição e a redução da frequência cardíaca que inibidores

neuro-hormonais são conhecidos por induzir (Maack *et al.* 2003). Sabe-se que o controle direto dos bronquíolos pelas fibras nervosas simpáticas é relativamente fraco, e por isso, dependente da noradrenalina e da adrenalina liberadas na corrente sanguínea pela estimulação simpática da glândula adrenal. Ambos os hormônios causam dilatação dos bronquíolos via estimulação dos receptores adrenérgicos (Guyton e Hall, 2017). Contudo, bucindolol exibe atividade agonista parcial no miocárdio humano, e, portanto, sua administração resulta em uma broncoconstrição expressivamente inferior aos demais betabloqueadores desta categoria (Maack *et al.*, 2003). Em relação à frequência cardíaca, em resultado anterior do nosso laboratório (Lima-Seolin *et al.*, 2017), não observamos diferenças significativas entre animais tratados com bucindolol e os demais grupos experimentais. Com os resultados obtidos e as características farmacológicas do bucindolol, claramente podemos inferir que sua administração é a mais segura para pacientes com doenças cardíacas e respiratórias (Maack *et al.*, 2003), sobressaindo até mesmo o betabloqueador carvedilol.

11. CONCLUSÃO

Os resultados dos estudos permitem concluir que:

***In Vivo* (Modelo experimental de HAP induzida por monocrotalina):**

- A aplicação da monocrotalina foi efetiva em induzir a HAP.
- O bucindolol atenuou a disfunção endotelial, encontrada nos animais monocrotalina, através da redução do ETAR e da razão ETAR / ETBR no tecido pulmonar, sem atuar sobre a enzima eNOS.
- Os animais com HAP apresentaram um incremento na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT nos pulmões, suficiente para evitar o aumento na lipoperoxidação. O bucindolol não foi eficaz em modificar este quadro.
- O bucindolol reduziu a produção de peroxinitrito na vasculatura pulmonar, inferida pela marcação com nitrotirosina, que estava aumentada nos animais monocrotalina.
- O bucindolol atenuou o remodelamento da vasculatura pulmonar através da redução da espessura da camada média.
- O bucindolol minimizou a RVP neste modelo de HAP, tornando menor o esforço do miocárdio para exercer sua função de bomba.

***In Vitro* (Cultura de células H9c2 expostas à ação da noradrenalina):**

- O bucindolol reduziu a sinalização para hipertrofia patológica através da redução da expressão/atividade das proteínas STAT3, PI3K, Akt, mTOR e p70 S6K.

- O bucindolol aumentou a sinalização para autofagia através da estimulação da via de sinalização da AMPK e do aumento da razão LC3-II / LC3-I, sendo este um efeito citoprotetor.
- O bucindolol reduziu a sinalização para apoptose, que foi aumentada nos grupos monocrotalina, através da diminuição da ativação da caspase 3/7.
- A exposição à noradrenalina aumentou as EROs presentes nos cardiomiócitos e a lipoperoxidação (4-HNE). O bucindolol foi eficaz em reduzir a formação de EROs e de 4-HNE.

Desta forma, estes achados suportam o uso do betabloqueador bucindolol como estratégia terapêutica para intervenção clínica, a fim de limitar tanto o processo de remodelamento vascular quanto o processo de remodelamento cardíaco patológico, bem como suas alterações funcionais, evitando a progressão para a insuficiência cardíaca.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEOVA, A. et al. Role of the excessive amounts of circulating catecholamines and glucocorticoids in stress-induced heart disease. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 2009, 87(7): 493-514.

ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. 6ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2017.

ALGECIRAS-SCHIMNICH, A. et al. Apoptosis-independent function of killer caspases. **Current Opinion in Cell Biology**, 2002; 14(6):721-726.

ALVES, J. L. et al. Pulmonary arterial hypertension in the southern hemisphere: results from a registry of incident Brazilian cases. **Chest**, 2015; 147(2):495-501.

AMERI, P. et al. Neurohormonal activation and pharmacological inhibition in pulmonary arterial hypertension and related right ventricular failure. **Heart Failure Reviews**, 2016; 21(5):539-547.

ANGELIS, K. de et al. Sistema nervoso autônomo e doença cardiovascular. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, 2004; 3:1-7.

AOYAGI, T.; MATSUI, T. Phosphoinositide-3 kinase signaling in cardiac hypertrophy and heart failure. **Current Pharmaceutical Design**, 2011; 17(18):1818-1824.

ARÁNGUIZ-URROZ, P. Beta (2)-adrenergic receptor regulates cardiac fibroblast autophagy and collagen degradation. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2011; 12(1):23-31.

ARAUJO, A. S. R. et al. Myocardial antioxidant enzymes activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2006; 249:133–139.

AUSTIN, E. D. et al. Gender, sex hormones and pulmonary hypertension. **Pulmonary Circulation**, 2013; 3(2):294-314.

BAKER, J. G. et al. Predicting in vivo cardiovascular properties of beta-blockers from cellular assays: a quantitative comparison of cellular and cardiovascular pharmacological responses. **The FASEB Journal**, 2011; 25:4486-4497.

BADESCH, D. B. et al. Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, 2009; 54(1):55-66.

BAEHRECKE, E.H. Autophagy: dual roles in life and death? **Nature Reviews, Molecular Cell Biology**, 2005; 6(6):505-510.

BALIGA, R. S.; MACALLISTER, R. J.; HOBBS, A. J. Vasoactive peptides and the pathogenesis of pulmonary hypertension: role and potential therapeutic application. **Handbook of Experimental Pharmacology**, 2013; 218:477-511.

BATLOUNI, M.; ALBUQUERQUE, D. C. de. Bloqueadores beta-adrenérgicos na Insuficiência Cardíaca. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2000; 75(4):339-349.

BEAULOYE, C. et al. AMPK activation, a preventive therapeutic target in transition from cardiac injury to heart failure. **Cardiovascular Research**, 2011; 90(2):224-233.

BERNARDO, B. C. et al. Molecular distinction between Physiological and Pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacology & Therapeutics**, 2010; 128(1):191-227.

BLACK-MAIER, E. et al. Bucindolol hydrochloride in atrial fibrillation and concomitant heart failure. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, 2015; 1-10.

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

BOGAARD, H. J. et al. Adrenergic receptor blockade reverses right heart remodeling and dysfunction in pulmonary hypertensive rats. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2010; 182(5):652-660.

BOVERIS A.; CHANCE B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**, 1973; 134(3):707-716.

BRISTOW, M. R. β -adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. **Circulation**, 2000; 101:558-569

BROWN, L. et al. Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats. **Journal Cardiovascular Research**, 1998; 31(1):108-115.

BRYAN, S. et al. Cystathionine gamma-lyase-deficient smooth muscle cells exhibit redox imbalance and apoptosis under hypoxic stress conditions, **Experimental & Clinical Cardiology**, 2011; 16(4):36-41.

CASSERLY, B.; KLINGER, J. R. Brain natriuretic peptide in pulmonary arterial hypertension: biomarker and potential therapeutic agent. **Drug Desing, Development and Therapy**, 2009; 3:269-287.

CHEMLA, D. et al. Hemodynamic evaluation of pulmonary hypertension. **European Respiratory Journal**, 2002; 20:1314-1331.

CHEN, Y. et al. ET-A and NO-mediated signal transduction pathway in human capillary endothelial cells. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**, 2003; 284(2):243-249.

CHIONG, M. et al. Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. **Cell Death & Disease**, 2011; 2:e244.

CHIPUK, J. E. et al. The Bcl-2 family reunion. **Molecular Cell**, 2010; 37(3):299-310.

CHOUDHARY, S. et al. Cellular lipid peroxidation end-products induce apoptosis in human lens epithelial cells, **Free Radical Biology and Medicine**, 2002; 32:360-369.

COHN, J. N. et al. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. **The New England Journal of Medicine**, 1984; 311:819-23.

CROSSWHITE, P.; SUN, Z. Nitric oxide, oxidative stress and inflammation in pulmonary arterial hypertension. **Journal of Hypertension**, 2010; 28(2):201-212.

DAVANI, S. et al. Can stem cells mend a broken heart? **Cardiovascular Research**, 2005; 65(2):305-316.

DELBIN, M. A.; ANTUNES, E.; ZANESCO, A. Role of exercise training on pulmonary ischemia/reperfusion and inflammatory response. **The Brazilian Journal of Cardiovascular**, 2009; 24(4):552-561.

DRABKIN, D. L.; AUSTIN, J. H. Spectrophotometric studies II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobina and sulfhemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, 1935; 112:51-65.

DYER, K. L. Use of myocardial performance index in pediatric patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Journal of the American Society of Echocardiographic**, 2006; 19(1):21-27.

EICHHORN, E. J. et al. Effect of beta-adrenergic blockade on myocardial function and energetics in congestive heart failure. Improvements in hemodynamic performance, contractile and diastolic bucindolol. **Circulation**, 1990; 82(2):473-483.

EICHHORN, E. J. Effects of bucindolol in heart failure. **The American Journal of Cardiology**, 1993; 71(9):65-70.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicology Pathology**, 2007; 35(4):495-516.

FARAHAMAND, F. et al. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2004; 260:21-29.

FLOHE, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, 1984; 105:114-121.

FUKURODA, T. et al. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1994; 199(3):1461-1465.

GALIÈ, N.; MANES, A.; BRANZI, A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. **Cardiovascular Research**, 2004; 61(2):227-237.

GALIÈ, N. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. **European Respiratory Journal**, 2015; 34:1219-1263.

GASCHLER, M. M. e STOCKWELL, B. R. Lipid peroxidation in cell death, **Biochemical and Biophysics Research Communications**, 2017; 482(3):419-425.

GAO, X. et al. HSP70 inhibits stress-induced cardiomyocyte apoptosis by competitively binding to FAF1. **Cell Stress Chaperones**, 2015; 20(4):653-661.

GOMEZ-ARROYO, J. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. **American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology**, 2012; 302:363-369.

GLICK, D. et al. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **The Journal of Pathology**, 2010; 221(1):3-12.

GRANGER, D. et al. Microvascular responses to cardiovascular risk factors. **Microcirculation**, 2010; 17(3):192-205.

GUPTA, M. K. et al. A assessment of the role of reactive Oxygen Species and redox signaling in norepinephrine-induced apoptosis and hypertrophy of H9c2 cardiac myoblasts, 2006; **Antioxidants Redox Signaling**, 2006; 8(5-6):1081-1093.

GURTU, V.; MICHELAKIS, E. D. Emerging therapies and future directions in pulmonary arterial hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, 2015; 31(4):489-501.

HE, C.; KLIONSKY, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. **Annual Review of Genetics**, 2009; 43:67-93.

HEIN, S. et al. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. **Circulation**, 2003; 107(7):984-991.

HOEPER, M. M.; GRANTON, J. Intensive care unit management of patients with severe pulmonary hypertension and right heart failure. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2011; 184:1114-1124.

HOEPER M. M. et al. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, 2013; 24(62):42-50.7

HOEPER M. M. et al. Elderly patients diagnosed with idiopathic pulmonary arterial hypertension: results from the COMPERA registry. **International Journal of Cardiology**, 2013; 168(2):871- 880.

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

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature Reviews – Cancer**, 2002; 2(4):277-288.

ISHIKAWA, M. et al. Effects of a pure alpha/beta-adrenergic receptor blocker on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension with right ventricular hypertrophy in rats. **Circulation Journal**, 2009; 73(12):2337-2341.

JANSA, P. et al. Epidemiology and long-term survival of pulmonary arterial hypertension in the Czech Republic: a retrospective analysis of a nationwide registry. **BMC Pulmonary Medicine**, 2014; 14:45.

JUNG, C. H. et al. mTOR regulation of autophagy. **FEBS Letters**, 2010; 584(7):1287-1295.

KAKOUROS, N. et al. Tissue doppler imaging of the tricuspid annulus and myocardial performance index in the evaluation of right ventricular involvement in

the acute and late phase of a first inferior myocardial infarction. **Echocardiography**, 2011; 28(3):311-319.

KAO, D. P. et al. Effect of bucindolol on heart failure outcomes and heart rate response in patients with reduced ejection fraction heart failure and atrial fibrillation. **European Journal of Heart Failure**, 2013; 15(3):324-333.

KIM, J. et al. Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. **Cell**, 2013; 152(1-2):290-303.

KISHORE, R.; VERMA, S. Role of STATs signaling in cardiovascular diseases. **JAK-STAT**, 2012; 1(2):118-124.

KOJIMA, T. et al. Endothelin-1 has a priming effect on production of superoxide anion by alveolar macrophages: its possible correlation with bronchopulmonary dysplasia. **Pediatric Research**, 1996; 39(1):112-116.

KONSTANTINIDIS, K. et al. Mechanisms of cell death in heart disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 2012; 32(7):1552-1562.

KRISHNAMURTHY, P. et al. Beta 1 integrins modulate beta-adrenergic receptor stimulates cardiac myocyte apoptosis and myocardial remodeling. **Hypertension**, 2007; 49(4):865-872.

KUC, R. E. et al. Modulation of endothelin receptors in the failing right ventricle of the heart and vasculature of the lung in human pulmonary arterial hypertension. **Life Science**, 2014; 118(2):391-396.

LAEMMLI, V. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 1970; 227:680-685.

LAVANDERO, S. et al. Autophagy in cardiovascular biology. **The Journal of Clinical Investigation**, 2015; 125(1):55-64.

LEHMANN, L. H. et al. The role of endothelin-1 in the sympathetic nervous system in the heart. **Life Science**, 2014; 118(2):165-172.

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

LIAO, J. K. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. **The Journal of clinical investigation**, 2013; 123(2):540–541.

LIMA-SEOLIN et al. Bucindolol improves right ventricle function in rats with pulmonary arterial hypertension through the reversal of autonomic imbalance. **European Journal of Pharmacology**, 2017; 798:57-65.

LING, Y. et al. Changing demographics, epidemiology, and survival of incident pulmonary arterial hypertension: results from the pulmonary hypertension registry of the United Kingdom and Ireland. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2012; 186(8):790-796.

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

LOUIS, X. L. et al. Blueberry polyphenols prevent cardiomyocyte death by preventing calpain activation and oxidative stress. **Food & Function**, 2014; 5(8):1785-1794.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, 1951; 193(1):265-275.

LUSHCHAK, V. I. Classification of oxidative stress based on its intensity. **Experimental and Clinical Sciences**, 2014; 13:922-923.

MAACK, C. et al. Partial agonist activity of bucindolol is dependent on the activation state of the human B1-adrenergic receptor. **Circulation**, 2003; 108:348-353.

MAN, F. S .de et al. Bisoprolol delays progression towards right heart failure in experimental pulmonary hypertension. **Circulation Heart Failure**, 2012; 5(1):97-105.

MAN, F. S. de; HANDOKO, M. L. β -blockers in pulmonary arterial hypertension: evolving concepts of right heart failure. **Pulmonary Vascular Diseases**, 2015; 46:619-621.

MARKLUND, S. **Autoxidação do pirogallol**. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. EUA: Boca Raton, 1985.

MARTINEZ, S. T. et al. A determinação estrutural do alcaloide pirrolizidínico monocrotalina: exemplo dos desafios da química de produtos naturais até os anos sessenta do século XX. **Revista Virtual de Química**, 2013; 5(2):300-311.

McLAUGHLIN, V. V. et al. Management of pulmonary arterial hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, 2015; 65(18):1976-1997.

MEYRICK, B. et al. Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. **The American Journal of Physiology**, 1980; 239(5):692-702.

MOCUMBI A. O.; THIENEMANN F.; SLIWA K. A global perspective on the epidemiology of pulmonary hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, 2015; 31(4):375-381.

MONTANI, D. et al. Pulmonary arterial hypertension. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, 2013; 8(1):97.

MURPHY, M. P. et al. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. **Cell Metabolism**, 2011; 13(4):361-366.

NAKAMURA, K. et al. Central effects of endothelin and its antagonists on sympathetic and cardiovascular regulation in shr-sp. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, 1999; 33:876-88.

NAKAOKA, M. An alpha-adrenergic agonist protects hearts by inducing Akt1-mediated autophagy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2015; 456(1):250-256.

NEWBY, A. C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. **Cardiovascular Research**, 2006; 69(3):614-624.

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

OGAWA A.; EJIRI K.; MATSUBARA H. Long-term patient survival with idiopathic/heritable pulmonary arterial hypertension treated at a single center in Japan. **Life Science**, 2014; 118(2):414-419.

OHKAWA, H. et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, 1979; 95(2):351-358.

OKUMURA, K. et al. Carvedilol improves biventricular fibrosis and function in experimental pulmonary hypertension. **Journal of Molecular Medicine**, 2015; 93:663-674

PEACOCK A. J. et al. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. **European Respiratory Journal**, 2007; 30(1):104-109.

PAN et al. Red blood cells augment transport of reactive metabolites of monocrotaline from liver to lung in isolated and tandem liver and lung preparations. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 1991; 110(2): 336-346.

PEDRAM, A. et al. Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. **The Journal of Biological Chemistry**, 1997; 272(27):17097-17103.

PERROS et al. Nebivolol for improving endothelial dysfunction, pulmonary vascular remodeling, and right heart function in pulmonary hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, 2015; 65(7):668-680.

PLATT, et al. Peroxynitrite increases VEGF expression in vascular endothelial cells via STAT3. **Free Radical Biology & Medicine**, 2005; 39(10):1353-1361.

POLJSAK, B. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2011; 1-15.

POLONIO, I. B. et al. Comparison of two experimental models of pulmonary hypertension. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 2012; 38(4):452-460.

PÖNICKE, K. et al. Differential effects of bucindolol and carvedilol on noradrenalina-induced hypertrophic response in ventricular cardiomyocytes of adult rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 2002; 301(1):71-76.

PORTT, L. et al. Anti-apoptosis and cell survival: a review. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2011; 1813(1):238-159.

PRZYKLENK, K. et al. Autophagy as a therapeutic target for ischaemia/reperfusion injury? Concepts, controversies, and challenges. **Cardiovascular Research**, 94(2):197-205.

PUGLIESE, S. C. et al. The role of inflammation in hypoxic pulmonary hypertension: from cellular mechanism to clinical phenotypes. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, 2014; 308(3):229-252.

QUEIROZ, E. A. I. F. et al. Metformin induces apoptosis and cell cycle arrest mediated by oxidative stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 breast cancer cells, **PLoS One**, 2014; 9(5): e98207.

RABINOVITCH, M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. **The Journal of Clinical Investigation**, 2008; 118:2372-2379.

REMME, W. J. Pharmacological modulation of cardiovascular remodeling: a guide to heart failure therapy. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, 2003; 17(4):349-360.

RENDQVIST, B. et al. Increased cardiac adrenergic drive precedes generalized sympathetic activation in human heart failure. **Circulation**, 1997; 95:169-175.

RICH S. et al. Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. **Annals of Internal Medicine**, 1987; 107(2):216-223.

RHODEN, E. L.; RHODEN, C. R. **Princípios e técnicas em experimentação animal**. 1º edição. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2006.

ROTHERMEL, B. A.; HILL, J. A. Autophagy in load-induced heart disease. **Circulation Research**, 2008; 103(12):1363-1369.

RUBIN, L. J. The beta-adrenergic receptor in pulmonary arterial hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, 2015; 65(7): 681-683.

RUDSKI, L. G. et al. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and t. **Journal of the American Society of Echocardiography: official publication of the American Society of Echocardiography**, 2010; 23(7):685-713.

RUNO, J. R.; LOYD, J. E. Primary pulmonary hypertension. **Lancet**, 2003; 361:1533-1544.

SALEEN, N.; GOSWAMI, S. K. Activation of adrenergic receptor in H9c2 cardiac myoblasts co-415 stimulates Nox2 and the derived ROS mediate the downstream responses, **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2017; 416:167–178.

SIMONNEAU, G. et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, 2013; 62(25): 34-41.

SHAH, M., et al. Monocrotaline pyrrole-induced endothelial cell megalocytosis involves Golgi blockade mechanism. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, 2005; 288(4):850-862.

SHIN, S. Y. et al. The switching role of beta-adrenergic receptor signalling in cell survival or death decision of cardiomyocytes. **Nature Communications**, 2014; 5:5777.

SHULMAN, L. L. et al. Platelet activation and fibrinopeptide formation in pulmonary hypertension. **Chest**, 1993; 104:1690-1693.

SITI, H. N. et al. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascular Pharmacology**, 2015; 71:40-56.

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

SUSNOW, N. et al. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. **Seminars in Cancer Biology**, 2009; 19(1):42-49.

TANIDA, I. et al. LC3 and autophagy. **Methods in Molecular Biology**, 2008; 445:77-88.

THAKUR, A. et al. Norepinephrine-induced apoptotic and hypertrophic responses in H9c2 cardiac myoblasts are characterised by different repertoire of reactive Oxygen Species generation. **Redox Biology**, 2015. 5:243-252.

TERMAN, A.; BRUNK, U. T. Autophagy in cardiac myocyte homeostasis, aging, and pathology. **Cardiovascular Research**, 2005; 68(3):355-365.

THENAPPAN, T. et al. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. **BMJ Clinical Research**, 2018; 360:j5492.

TOKARNIA, C et al. Plantas experimentalmente tóxicas para bovinos, porém incerto se de interesse pecuário. In: **Plantas Tóxicas do Brasil**. 2º ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. 240-242.

TRIPOSKIADIS et al. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. **Journal of the American College of Cardiology**, 2009; 54:1747-1762.

TUDER, R. M. et al. Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, 2013; 62(25):4-12.

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**, 2010; 299(3):401-412.

VAILLANCOURT, M. et al. Adaptation and remodelling of the pulmonary circulation in pulmonary hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, 2014; 31:407-415.

VAN EMPEL, V. P et al. Myocyte apoptosis in heart failure. **Cardiovascular Research**, 2005; 67(1):21-29.

VARSHNEY, R. et al. Monocrotaline-induced pulmonary hypertension involves downregulation of antiaging protein klotho and eNOS activity. **Hypertension**, 2016; 68(5): 1255-1263.

WEDGWOOD, S. et al. ET-1 stimulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species. **American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology**, 2001; 281(5):1058-1067.

WEST J.; HEMNES A. Experimental and transgenic models of pulmonary hypertension. **Comprehensive Physiology**, 2011; 1(2):769-782.

WHELAN, R. S. et al. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. **Annual Review Physiology**, 2010; 72:19-44.

YEE, S. B. et al. Synergistic hepatotoxicity from coexposure to bacterial endotoxin and the pyrrolizidine alkaloid monocrotalina. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2000; 173-185.

YIN, F. C. et al. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. **The American Journal of Physiology**, 1982; 243(6):941-947.

ZAMORA, M. A. et al. BQ123, an ETA receptor antagonist, inhibits endothelin-1-mediated proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 1993; 9(4):429-433.

ZHANG, X. Critical roles of STAT3 in beta-adrenergic function in the heart. **Circulation**, 2016; 133(1):48-61.

ZHU, H. et al. Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. **The Journal of Clinical Investigation**, 2007; 117(7):1782-1793.

ANEXO A – ARTIGO *IN VIVO*

Biomedicine & Pharmacotherapy 99 (2018) 704–714



Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biopha

Bucindolol attenuates the vascular remodeling of pulmonary arteries by modulating the expression of the endothelin-1 A receptor in rats with pulmonary arterial hypertension

Bruna Gazzi de Lima-Seolin^a, Matheus Mittmann Hennemann^a, Rafael Oliveira Fernandes^a, Rafael Colombo^b, Jéssica Hellen Poletto Bonetto^a, Rayane Brinck Teixeira^a, Neelam Khaper^c, Alessandra Eifler Guerra Godoy^d, Isnard Elman Litvin^d, Alex Sander da Rosa Araujo^a, Paulo Cavalheiro Schenkel^a, Adriane Belló-Klein^{a,*}

^a Laboratory of Cardiovascular Physiology and Reactive Oxygen Species, Institute of Basic Health Science, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Laboratory of Pharmacology and Physiology, Universidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil

^c Northern Ontario School of Medicine, Lakehead University, Ontario, Canada

^d Research Institute for Multicenter Studies, Universidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

Adrenergic receptor blocker
Bucindolol
Endothelin-1 receptor
Monocrotaline
Nitric oxide synthase

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the role of the β -adrenergic blocker bucindolol on endothelial dysfunction and pulmonary vascular remodeling in rats with pulmonary arterial hypertension (PAH). Male Wistar rats were divided into four groups: control, monocrotaline (MCT), control + bucindolol and monocrotaline + bucindolol (MCT + BCD). PAH was induced by an injection of monocrotaline (60 mg/kg i.p.). After two weeks, the animals were treated for seven days with bucindolol (2 mg/kg/day i.p.) or vehicle. Echocardiography was performed upon treatment completion to analyze pulmonary vascular resistance (PVR) and right ventricle (RV) myocardial performance index. Lungs were collected for oxidative stress and western blot analysis, and the pulmonary artery was analyzed for histological and immunohistochemical parameters. The MCT + BCD group showed a decrease (32%) in the protein expression of endothelin-1 type A receptor (ETAR) and in the ratio of ETA/endothelin-1 type B receptor (ETBR) (62%) as compared to the MCT group. Bucindolol treatment did not alter oxidative stress, as determined by lipid peroxidation analysis and antioxidant enzyme activities and expression, endothelial nitric oxide synthase immunocontent and decreased nitrotyrosine levels. Moreover, bucindolol improved vascular remodeling of the pulmonary artery in the MCT + BCD group by decreasing (21%) PVR and increasing RV workload in relation to MCT.

1. Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by an inflammatory response that causes an imbalance between vasoactive molecules, such as endothelin-1 (ET-1) and nitric oxide (NO) [1]. NO is a potent vasodilator [2] and inhibitor of smooth muscle cell proliferation [3] that is released in the vascular lumen, and its synthesis is catalyzed by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) enzyme [2]. On the other hand, ET-1 is a potent endogenous vasoconstrictor with proinflammatory, mitogenic, and profibrotic effects in smooth muscle cells. ET-1 effects are exerted by the stimulation of two types of

receptors: endothelin-1 type A receptor (ETAR) and endothelin-1 type B receptor (ETBR) [4]. An imbalance between NO and ET-1 promotes a reduction in the vessel's lumen, resulting in an increase in pulmonary vascular resistance (PVR) and mean pulmonary artery pressure (mPAP). Recent studies implicate oxidative stress as a mediator of PAH and the associated endothelial dysfunction. In fact, an increase in reactive oxygen species (ROS) production also contributes to vascular dysfunction [5].

Various models have been developed to understand the pathophysiology of PAH [6]. The most widely used model involves the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline, which is present in plants of the

* Corresponding author at: Rua Sarmento Leite, 500, Bairro Farroupilha – CEP: 90050-170, Porto Alegre / RS/Brazil.

E-mail addresses: bruna.gazzi@hotmail.com (B.G. de Lima-Seolin), matheusmhennemann@gmail.com (M.M. Hennemann), rafafernandes.fisio@gmail.com (R.O. Fernandes), rcolombo1@ucs.br (R. Colombo), jpbnetto@gmail.com (J.H.P. Bonetto), raybrinck@gmail.com (R.B. Teixeira), nkhaper@nosm.ca (N. Khaper), aegodoy@gmail.com (A.E.G. Godoy), ielitvin@ucs.br (I.E. Litvin), alex.rosa@ufrgs.br (A. Sander da Rosa Araujo), paulo.schenkel@ufrgs.br (P.C. Schenkel), belklein@ufrgs.br (A. Belló-Klein).

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.127>

Received 22 November 2017; Received in revised form 26 January 2018; Accepted 28 January 2018
0753-3322/© 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Crotalaria genus [7,8]. It is known that its active metabolite, dehydromonocrotaline, accumulates in erythrocytes, enhancing the transit of this metabolite from the liver to the lungs, where it is released in the pulmonary endothelium [9]. Thus, dehydromonocrotaline promotes structural and functional changes in lung and pulmonary vasculature, leading to a sustained elevation of mPAP with clinical features that resemble human idiopathic PAH [10]. Recent studies have shown that adrenergic receptor blockade decreases mPAP and improves right ventricle (RV) function in PAH [11,12,13]. However, the use of β -blockers for the treatment of PAH is controversial, due to possible negative effects on hemodynamics and exercise capacity [14]. Thus, more research is warranted to study β -blocker efficacy.

Bucindolol is a lipophilic β -blocker agent with a hepatic metabolism by cytochrome P450. The half-life of bucindolol is 8 ± 4.5 h [15], and it is a β_1 - β_2 -blocker with mild vasodilatory properties by an α_1 -antagonism [16]. Moreover, bucindolol presents sympatholytic effects and reduces systemic norepinephrine levels in patients with increased sympathetic activity [17]. In a recent study of bucindolol in a model of PAH induced by monocrotaline, our group has shown attenuation of mPAP and an improvement in RV systolic function [11]; however, its effects on lung tissue and pulmonary artery are unknown. Thus, the present study aimed to evaluate the effects of bucindolol on vasoactive mediators, lung oxidative stress, and pulmonary artery remodeling induced by monocrotaline.

2. Methods

2.1. Ethical approval

All animal procedures performed in this study were in accordance with the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" published by the National Institutes of Health (NIH Publication, 8th Edition, 2011), and conformed to the Ethical Committee on the Use of Animals of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (approval number 30484).

2.2. Experimental design

Male Wistar rats weighing 180 ± 5 g were obtained from the Center of Reproduction and Experimentation of Laboratory Animals at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. All animals ($n = 36$)

received water and food *ad libitum* (Nuvilab CR-1; Nuvital, São Paulo, SP, Brazil) and were housed at a temperature of 20–25 °C with 70% humidity, under a 12-hour light/dark cycle. Animals were divided into four groups: 1) CTR - animals that did not receive monocrotaline or treatment with bucindolol; 2) MCT - animals that received monocrotaline alone; 3) CTR + BCD - animals that were treated with bucindolol alone; and 4) MCT + BCD - animals that received monocrotaline and bucindolol treatments. The animals in the MCT and MCT + BCD groups received a single intraperitoneal injection of monocrotaline (60 mg/kg) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), and animals in the CTR and CTR + BCD groups received saline in the same conditions [18]. After two weeks, animals in the CTR + BCD and MCT + BCD groups were given intraperitoneal injections of bucindolol (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) daily for 7 days (2 mg/kg per day), and the CTR and MCT groups were injected with vehicle (saline) [19]. At the end of the treatment, animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) for RV function assessment using echocardiography. Subsequently, the animals were sacrificed for tissue collection (lungs, pulmonary artery, RV, and right tibia). The lungs were immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at -80 °C for enzymatic and Western blot analysis. The pulmonary artery was immersed in formalin buffer for histological and immunohistochemical assessment. The RV weight and length of the tibia were measured for the morphometric analysis.

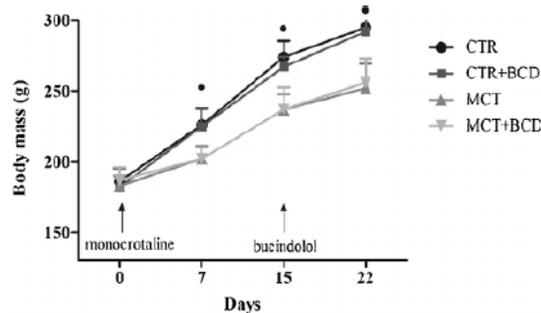


Fig. 1. Body weight gain in Wistar rats receiving monocrotaline (60 mg/kg - i.p.) or saline. Vehicle or bucindolol (2 mg/kg/day - i.p.) was started at day 15 for 7 days. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 7-10$). Temporal analysis was assessed by repeated measures ANOVA. * $P < .05$ MCT and MCT + BCD vs. CTR and CTR + BCD. CTR: received saline and vehicle; MCT: received monocrotaline and vehicle; CTR + BCD: received saline and bucindolol; and MCT + BCD: received monocrotaline and bucindolol.

Table 1

Effects of daily treatment with bucindolol (2 mg/kg - i.p.) or vehicle for 7 days on morphometric and echocardiograph parameters in Wistar rats treated with saline or monocrotaline (60 mg/kg).

Parameters	CTR	MCT	CTR + BCD	MCT + BCD
RV (g)	0.19 ± 0.04	$0.25 \pm 0.06^{*\nabla}$	0.18 ± 0.02	$0.24 \pm 0.03^{**}$
RV/tibia length (mg/mm)	5.68 ± 1.10	$7.49 \pm 1.79^{*\nabla}$	5.28 ± 0.69	$7.27 \pm 0.94^{**}$
AT/ET (s/s)	0.34 ± 0.01	$0.23 \pm 0.02^{*\nabla}$	0.32 ± 0.04	$0.28 \pm 0.02^{*\dagger}$
MPI	0.19 ± 0.01	$0.38 \pm 0.12^{\nabla}$	0.29 ± 0.12	$0.26 \pm 0.04^{\dagger}$

Values are expressed as mean \pm SD ($n = 6-10$). * $P < .05$ MCT and MCT + BCD vs. CTR and CTR + BCD; $\nabla P < .05$ MCT vs. CTR; $^{\dagger} P < .05$ MCT + BCD vs. CTR + BCD; $^{**} P < .05$ MCT + BCD vs. MCT. RV: right ventricle; AT/ET: relationship between acceleration time through the pulmonary artery and the ejection time through the pulmonary artery; PVR: pulmonary vascular resistance; MPI: RV myocardial performance index. CTR, received saline and vehicle; MCT, received monocrotaline and vehicle; CTR + BCD, received saline and bucindolol; MCT + BCD, received monocrotaline and bucindolol.

2.3. Functional assessment

Echocardiographic images were obtained in the two-dimensional mode and pulsed wave Doppler mode (HD7 Ultrasound System; Philips, Andover, MA, USA) using a S12-4 transducer (Philips, Andover, MA, USA). The PVR was calculated by the relationship between acceleration time to ejection time through the pulmonary artery (AT/ET). The RV myocardial performance index (MPI) was determined using the following formula: $MPI = (\text{time of closing of the tricuspid valve} - \text{time of ejection through the pulmonary artery}) / \text{time of ejection through the pulmonary artery}$ [20,21].

2.4. Morphometric assessment

The body weight of the animals was measured weekly to assess the effect of the PAH and the treatment on the body mass gain. The RV hypertrophy was determined by the ratio between RV mass/tibia length [22].

2.5. Histological analysis

Pulmonary arteries were fixed in 4% formalin for 24 h. Subsequently, the samples were immersed in paraffin overnight before tissue processing. The histological laminas were prepared as 3- μ m thick sections, which were stained with hematoxylin and eosin [23], then observed with an optical microscope (DME; Leica Microsystems Inc.,

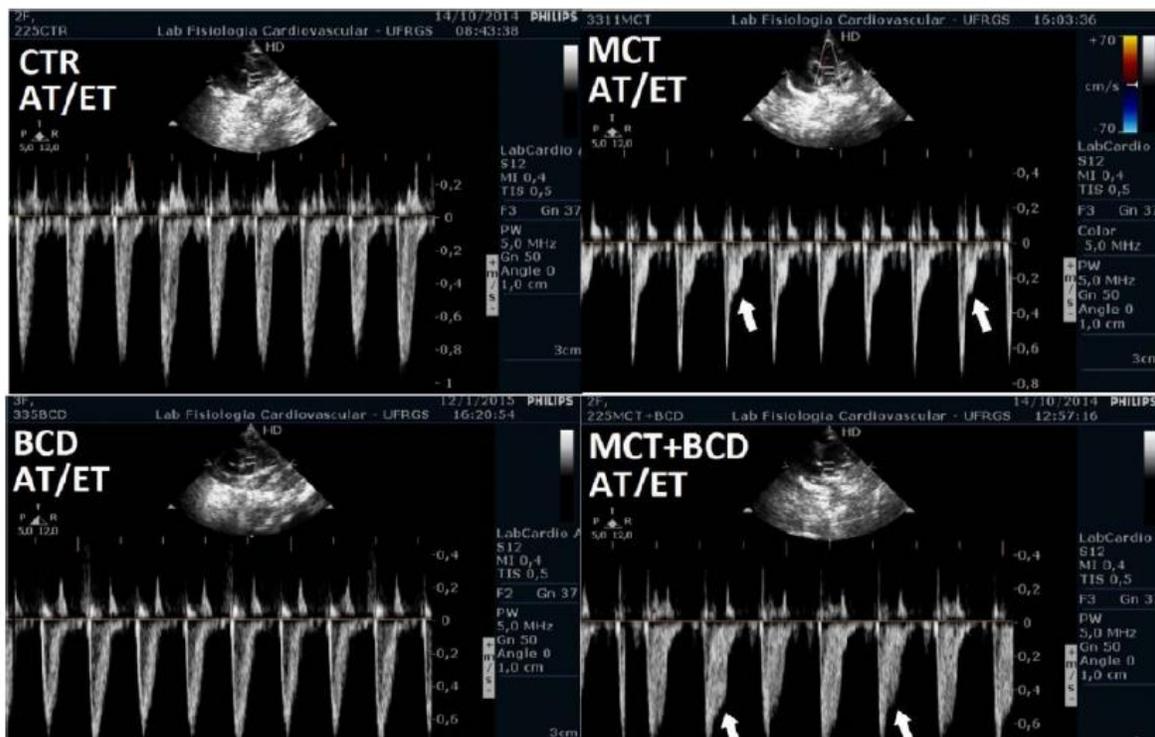


Fig. 2. Representative echocardiographic images from rats receiving saline or monocrotaline (60 mg/kg – i.p.) treated with a daily injection of either vehicle or bucindolol (2 mg/kg – i.p.) over 7 days. Images show the relationship between acceleration time through the pulmonary artery and the ejection time through the pulmonary artery (AT/ET). Representative AT/ET from the CTR group (A); MCT group (B); CTR + BCD group (C); and MCT + BCD group (D). Arrows indicate the presence of mid-systolic notching caused by a rise in ejection time in the monocrotaline groups (MCT and MCT + BCD).

New York, USA). Images were obtained from a microscope coupled to a camera (EC 3; Leica Microsystems Inc., New York, USA). The pulmonary artery laminas were analyzed independently by two pathologists for artery wall thickness and inflammatory cell infiltration. The values from the two pathologists were averaged, and the result is presented as the mean value or relative frequency. Inflammatory cell infiltration was considered mild (up to 30%), moderate (30–70%), or accentuated (above 70%).

2.6. Immunohistochemistry analysis

The immunohistochemical method was performed using the semi-automated AutoStainer Link 48 (Dako system, Carpinteria, CA, USA). Pulmonary arteries were fixed in 10% formalin for 24 h. Subsequently, the samples were immersed in paraffin overnight before tissue processing. The histological laminas were prepared as 5- μ m thick sections, which were stained with hematoxylin and eosin and sectioned with 3- μ m of thickness. Additional fixed tissue sections were deparaffinized and rehydrated. The slides were immersed in antigen retrieval solution (diluted 1:10) and kept in a water bath (97°C) for 20 min. Immunodetection was performed using the monoclonal nitrotyrosine antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) with a dilution of 1:300 for 20 min. Subsequently, the slices were dehydrated in

ethanol and diaphanized in xylene. Negative and positive controls were used for each reaction [23]. The slices were analyzed using an optical microscope (DME; Leica Microsystems Inc., New York, USA) and digital camera (EC 3; Leica Microsystems Inc., New York, USA). The values from the two pathologists were averaged and the result for each sample was expressed as a relative frequency, considering mild (up to 30%),

moderate (30–70%) or accentuated (above 70%). It is known that nitrotyrosine is the end product of peroxynitrite production, therefore, its detection has been proposed as an indirect marker of peroxynitrite production.

2.7. Lung preparation for biochemical assays

Lung tissue was homogenized in 1.15% KCl (w/v) and 20 mmol/L phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF) in an Ultra-Turrax homogenizer (Bosch, Atibaia, SP, Brazil) for 40 s, and the suspension was centrifuged at 1000 \times g for 20 min at 4°C [24]. The supernatants were used to measure antioxidant enzyme activities and evaluate lipid peroxidation.

2.8. Determination of protein and hemoglobin concentration

Protein was measured by the method of Lowry [25], with bovine serum albumin as the standard, at 625 nm (Anthos Zenyth 200 Spectrophotometer; Biochrom, Holliston, MA, USA) and expressed as milligram per milliliter. Determination of hemoglobin concentrations, in order to inhibit its oxidative activity in measuring Glutathione peroxidase (GPx) activity, were carried out by conversion of hemoglobin to cyanomethemoglobin using Drabkin reagent against a standard curve,

measured at 546 nm (Cary 1E Spectrophotometer; Varian, Victoria, AU), and expressed as milligram per milliliter [26].

2.9. Determination of antioxidant enzyme activities

Superoxide dismutase (SOD) activity, expressed as units per

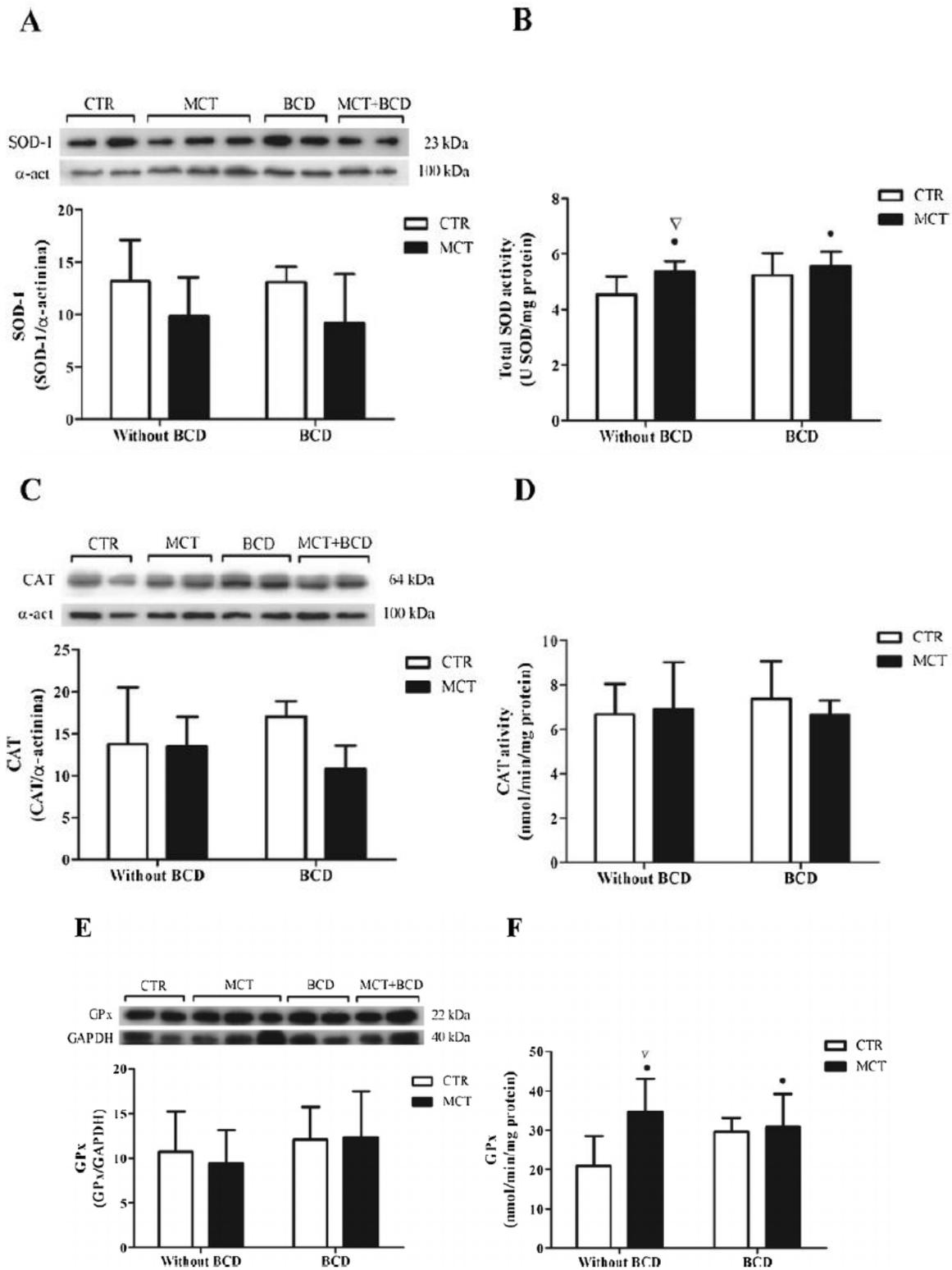


Fig. 3. Representative immunoblot and activity of antioxidant enzymes in lung homogenates of Wistar rats. The animals received single injections of monocrotaline (60 mg/kg - i.p.) or saline, and after 14 days were treated with bucindolol (2 mg/kg/day - i.p.) or vehicle for 7 days. Immunoblot of Cu-Zn superoxide dismutase (SOD-1) (3A) and total SOD activity (3B); immunoblot (3C) and activity (3D) of catalase (CAT); immunoblot (3E) and activity (3F) of glutathione peroxidase (GPx). Values are expressed as mean \pm SD. Immunoblot: $n = 3-5$. Activity of antioxidant enzymes: $n = 4-6$. Comparisons between groups for parametric data were performed by two-way ANOVA, with a Student-Newman-Keuls post-hoc test. $\bullet P < .05$ MCT and MCT + BCD vs. CTR and CTR + BCD; $\nabla P < .05$ MCT vs. CTR. CTR, received saline and vehicle; MCT, received monocrotaline and vehicle; CTR + BCD, received saline and bucindolol; MCT + BCD, received monocrotaline and bucindolol.

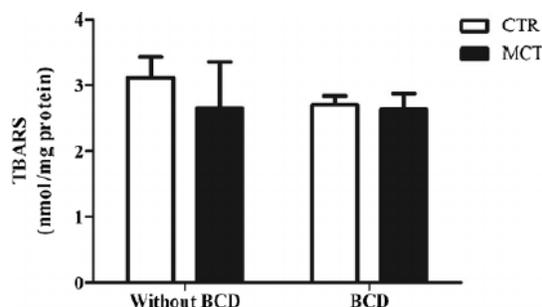


Fig. 4. Lipid peroxidation measured by determination of TBARS in lung homogenates of Wistar rats. The animals received single injections of monocrotaline (60 mg/kg - i.p.) or saline, and after 14 days were treated with bucindolol (2 mg/kg/day - i.p.) or vehicle for 7 days. Values are expressed as mean \pm SD (n = 4-6). Comparisons between groups for parametric data were performed by two-way ANOVA. CTR, received saline and vehicle; MCT, received monocrotaline and vehicle; CTR + BCD, received saline and bucindolol; MCT + BCD, received monocrotaline and bucindolol.

Table 2

Histological and immunohistochemical parameters of the pulmonary artery from saline- or monocrotaline (60 mg/kg - i.p.) - treated Wistar rats given bucindolol (2 mg/kg/day - i.p.) for 7 days.

Parameters	CTR	MCT	CTR + BCD	MCT + BCD
Nitrotyrosine (%)				
Absent	67	20	83	38
Mild	33	60	17	63
Moderate	0	20	0	0
Accentuated	0	0	0	0
Inflammatory cell infiltration (%)				
Absent	83	33	100	33
Moderate	0	67	0	67
Accentuated	0	0	0	0
Pulmonary artery thickness (mm)				
	0.14 \pm 0.05	0.26 \pm 0.05 ∇	0.22 \pm 0.08	0.18 \pm 0.07 \dagger

Histological and immunohistochemical grading are presented as the relative frequency (n = 6-10). Values for pulmonary artery thickness are expressed as the mean \pm SD (n = 5-8). $\nabla P < .05$ MCT vs. CTR; $\dagger P < .05$ MCT + BCD vs. MCT. CTR, received saline and vehicle; MCT, received monocrotaline and vehicle; CTR + BCD, received saline and bucindolol; MCT + BCD, received monocrotaline and bucindolol.

milligram of protein, was evaluated based on the inhibition of the superoxide radical reaction with pyrogallol and measured at 420 nm [27]. Catalase (CAT) activity, expressed as nanomoles of hydrogen peroxide (H_2O_2) reduced per minute per milligram of protein, was measured by following the decrease in H_2O_2 absorbance at 240 nm [28]. GPx activity was based on the consumption of NADPH. It was measured at 340 nm and expressed as nanomoles of peroxide/hydroperoxide reduced per minute per milligram of protein [29]. The spectrophotometer used was a Cary 1E Spectrophotometer (Varian, Victoria, AU).

2.10. Lipid peroxidation

For the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay, 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 20% acetic acid (pH 3.5), and 0.8% thiobarbituric acid were added to the lung homogenates, which were then incubated in a boiling water bath for 60 min. After cooling, the mixture was centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min. The supernatant was removed and measured spectrophotometrically (Anthos Zenyth 200;

Biochrom, Holliston, MA, USA) at 532 nm [30]. The results are expressed as nanomoles per milligram of protein.

2.11. Western blot analysis

The lungs were homogenized in a homogenizer (Ultra-Turrax; Bosch, Atibaia, SP, Brazil) with $10 \times$ cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) diluted in Mili-Q water and PMSF. The suspension was centrifuged at $8000 \times g$ for 15 min at $4^\circ C$. The supernatants were used for the assay, and the protein concentration was quantified using the Lowry method and used for normalization [25]. Fifty micrograms of protein was subjected to 10% one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and electrophoretically transferred onto polyvinylidene difluoride membranes, as previously described. Ponceau staining was performed, and the membrane was blocked with 5% non-fat milk in Tris-buffered saline (20 mmol/L Tris, 137 mmol/L NaCl) for 1 h at room temperature [31,32], and then incubated overnight at $4^\circ C$ with the following polyclonal IgG primary antibodies: ETAR (69 kDa), ETBR (50 kDa), eNOS (140 kDa), SOD-1 (23 kDa), CAT (64 kDa), and GPx (22 kDa) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA or Abcam, Cambridge, MA, USA). The bound primary antibodies were detected with anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, and were normalized to GAPDH (40 kDa) or α -actin (100 kDa) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Chemiluminescence reactions were detected by autoradiography (Hyperfilm ECL; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), which were analyzed by ImageJ software (Wayne Rasband, Research Services Branch, NIH, Bethesda, MD, USA).

2.12. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using Sigma Plot software (Version 12.0, Systat Software Inc., San Jose, USA). Normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. Comparisons between groups were performed by two-way ANOVA, with a Student-Newman-Keuls post-hoc test. Temporal analysis was achieved by repeated measures ANOVA. The correlation between variables was calculated using Pearson's correlation coefficient. Differences between groups were considered statistically significant when $P < .05$.

3. Results

3.1. Morphometric parameters

Fig. 1 demonstrates body mass gain over 22 days in all four groups. There was less body mass gain in monocrotaline group rats (MCT and MCT + BCD) than in the control group rats (CTR and CTR + BCD) from the 7th day of the experimental protocol. Moreover, both monocrotaline groups showed a significant increase (35%) in RV hypertrophy when compared to that of the control groups (Table 1). The treatment with bucindolol was not effective in attenuating these morphometric changes.

3.2. Functional parameters

The acceleration/ejection time (AT/ET) ratio was reduced by 23% in monocrotaline groups (MCT and MCT + BCD) in comparison to that of control groups (CTR and CTR + BCD), representing an increase in the PVR. Bucindolol treatment attenuated the increase in PVR in the MCT + BCD group when compared to that of the MCT group (Table 1). Representative images of pulmonary artery flow for each group are shown in Fig. 2, where the increased PVR present in the animals with PAH was attenuated by bucindolol.

The MPI increased by 100% in the MCT group in comparison to that of the CTR group, and it was reduced by 32% in the MCT + BCD group

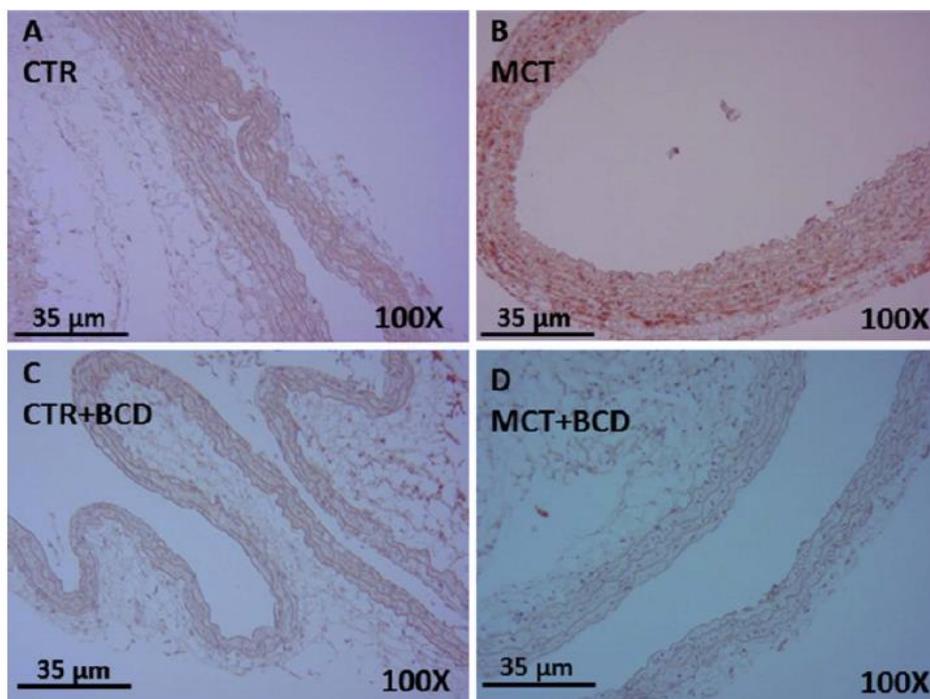


Fig. 5. Representative images of the pulmonary artery from rats receiving monocrotaline (60 mg/kg - i.p.) treated with a daily injection of either vehicle or bucindolol (2 mg/kg - i.p.) over 7 days. Samples were subjected to immunohistochemical staining for the identification of nitrotyrosine levels. Nitrotyrosine levels in the pulmonary artery of an animal from the CTR group (A); MCT group (B); CTR + BCD group (C); and MCT + BCD group (D). 400 × magnification was used.

over that of the MCT group (Table 1).

3.3. Oxidative stress parameters

Antioxidant enzyme expression and activity were analyzed in lung tissue preparations to determine the role of monocrotaline and bucindolol on the cellular antioxidant system. No differences in SOD-1 (Fig. 3A), CAT (Fig. 3C) or GPx (Fig. 3E) protein expression were observed in lung tissue after monocrotaline or bucindolol treatment. Total SOD activity (comprising CuZn-SOD and Mn-SOD) increased by 12% in the monocrotaline groups (MCT and MCT + BCD) when compared with that of the control groups (CTR and CTR + BCD) (Fig. 3B). No differences in CAT activity were observed between groups (Fig. 3D). GPx activity increased by 29% in rats that received monocrotaline (MCT and MCT + BCD) when compared with that of the control groups (CTR and CTR + BCD) (Fig. 3F). In addition, there was no significant difference in lipid peroxidation between any of the experimental groups (Fig. 4). The Pearson's test showed positive correlations between GPx and SOD activity ($P < .001$; $r = 0.624$). There was a negative correlation between GPx activity and lipid peroxidation ($P < .009$; $r = -0.539$).

The nitrotyrosine levels in the pulmonary artery were measured using an immunohistochemical approach. The MCT group showed mild levels in 60% of the tissue, moderate levels in 20%, and an absence of nitrotyrosine was observed in 20% of tissue preparations. The MCT + BCD group showed mild levels of nitrotyrosine in 63% of pulmonary artery tissue, no moderate levels, and nitrotyrosine was absent in 38% of tissue preparations (Table 2). Representative images of pulmonary artery nitrotyrosine levels for each group are shown in Fig. 5. The increases in nitrotyrosine levels present in the monocrotaline groups (MCT and MCT + BCD) were attenuated by bucindolol (Fig. 5).

3.4. Immunocontent of the vasoactive mediators

The effects of adrenergic receptor blockade by bucindolol on vasoactive molecules were explored. There was a significant decrease (76%) in eNOS immunocontent in both monocrotaline groups (MCT and MCT + BCD) compared to that of the control groups (CTR and CTR + BCD) (Fig. 6A), suggesting a decrease in NO. Bucindolol was not effective in reversing the decline in eNOS protein expression in the MCT + BCD group (Fig. 6A). ETBR protein expression was significantly less (43%) in rats that received monocrotaline (MCT and MCT + BCD) than in rats of the CTR and CTR + BCD groups (Fig. 6B). Moreover, the MCT group showed 49% less expression of ETBR in comparison with that of the CTR group, likewise the MCT + BCD group in relation to the CTR + BCD group (38%) (Fig. 6B). ETAR protein expression increased by 95% in the MCT group when compared to that of the CTR group. Furthermore, bucindolol was efficient in mitigating this increase because the MCT + BCD group demonstrated a 32% reduction in ETAR expression when compared to that of MCT group (Fig. 6C). The increase in the ETAR/ETBR ratio is associated with a worsening of vascular remodeling. This parameter increased significantly (336%) in the MCT group when compared to that of the CTR group, and it decreased by 50% in the MCT + BCD group as compared to that of the MCT group (Fig. 6D).

3.5. Histological analyses

The presence of inflammatory cells was observed in 17% of animals that receive saline. On the other hand, a moderate degree of inflammatory cells was present in 67% of animals from both groups receiving monocrotaline (MCT and MCT + BCD). Bucindolol treatment was not effective in reducing the degree of inflammatory cells (Table 2).

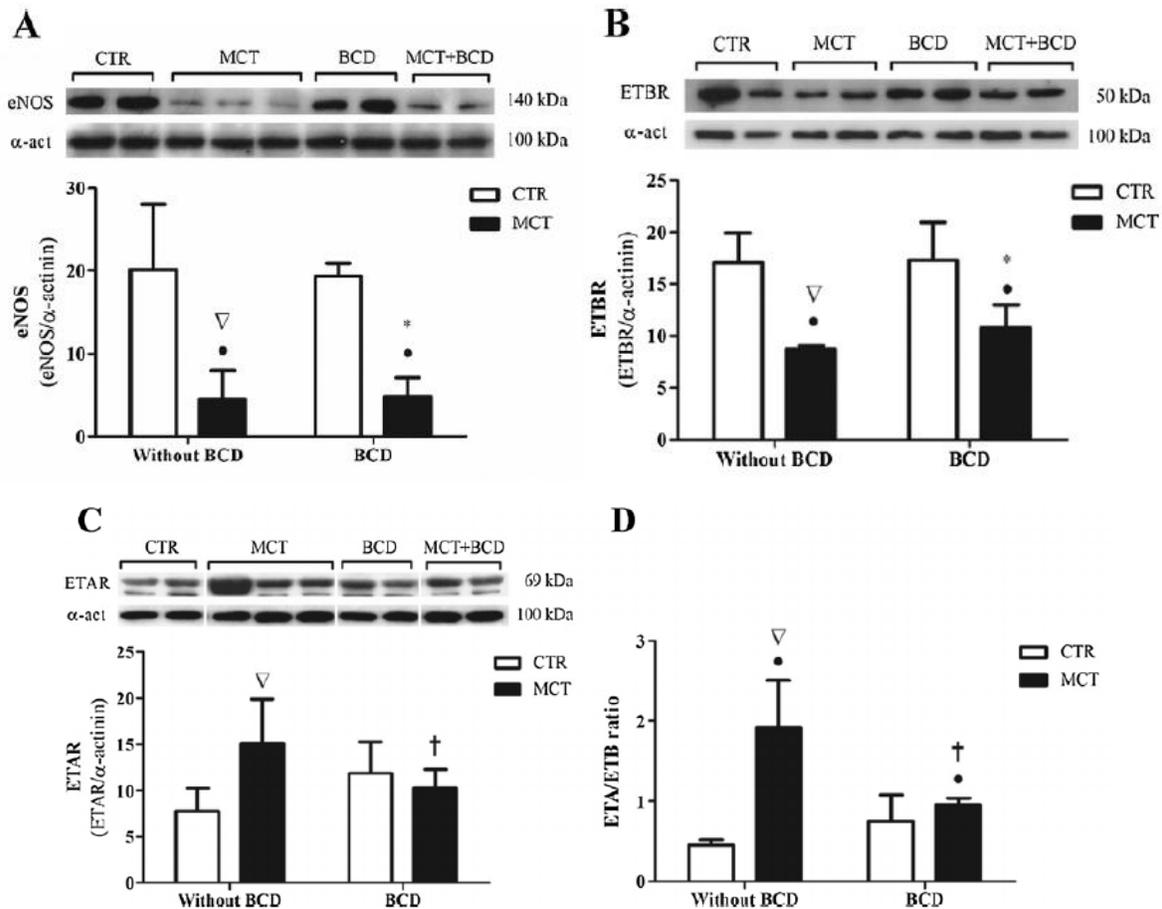


Fig. 6. Immunoccontent of the vasoactive mediators in lung homogenates of Wistar rats. The animals received single injections of monocrotaline (60 mg/kg – i.p.) or saline, and after 14 days were treated with bucindolol (2 mg/kg/day – i.p.) or vehicle for 7 days. Immunoccontent of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (6A), immunoccontent of endothelin receptor type B (ETBR) (6B), immunoccontent of endothelin receptor type A (ETAR) (6C), immunoccontent of ETAR/ETBR ratio (6D). Values are expressed as mean \pm SD (n = 3–5). Comparisons between groups for parametric data were performed by two-way ANOVA, with a Student-Newman-Keuls post-hoc test. * $P < .05$ MCT and MCT + BCD vs. CTR and CTR + BCD; $\nabla P < .05$ MCT vs. CTR; † $P < .05$ MCT + BCD vs. CTR + BCD; ‡ $P < .05$ MCT + BCD vs. MCT. CTR, received saline and vehicle; MCT, received monocrotaline and vehicle; CTR + BCD, received saline and bucindolol; MCT + BCD, received monocrotaline and bucindolol. The bands were cut so that the representation occurred in the same order as the other figures.

The infiltration of inflammatory cells was characterized by the presence of leukocytes among the vessel cells. Representative images of the presence of inflammatory cells in the pulmonary artery for each group are shown in Fig. 7. The Pearson's test showed negative correlations between eNOS protein expression and the presence of inflammatory cells ($P < .006$, $r = -.689$).

An increase in pulmonary artery wall thickness was observed in groups treated with monocrotaline (Fig. 8). The MCT + BCD group

demonstrated a significant reduction in wall thickness (31%) when compared to that of rats in the MCT group. ETAR expression and the ETAR/ETBR ratio were positively correlated with the thickness of the pulmonary artery wall ($P < .044$, $r = 0.545$; $P < .040$, $r = 0.624$, respectively).

4. Discussion

This study demonstrated, for the first time, an association between bucindolol treatment and decreased ETAR protein expression with a consequent reduction in the ETAR/ETBR ratio in a rat model of monocrotaline-induced PAH. This could be one of the potential underlying mechanisms involved in the attenuation of pulmonary artery

remodeling and elevated PVR induced by monocrotaline.

The estimated prevalence of PAH ranges from 15–26 cases per million, with an incidence of 10.7 cases per million per year [33,34]. Experimental models for the study of PAH have led to the development of all current therapeutic alternatives [35]. The monocrotaline rat model of PAH shows cardiovascular and pulmonary changes very similar to those for patients with PAH, and it is the most widely used model that mimics clinical PAH [8]. In this study, pulmonary and

cardiac morphometric and morphological parameters, and echocardiographic changes were consistent with those of previous studies using the same experimental model, confirming the validity and reproducibility of this model system [36,37].

One of the features of this model is the reduction in body weight gain in rats that develop PAH [36]. In this study, the rats that received saline (CTR and CTR + BCD) displayed normal body weight gain throughout the study. However, the body weight gain was significantly reduced in rats displaying PAH. It is known that a lack of appetite and weight loss are the first signs of various lung diseases [38], including PAH [39]. Difficulties in chewing and swallowing resulting from dyspnea and secretion accumulation are factors that can lead to inadequate food intake. In addition, rapid breathing and respiratory effort due to

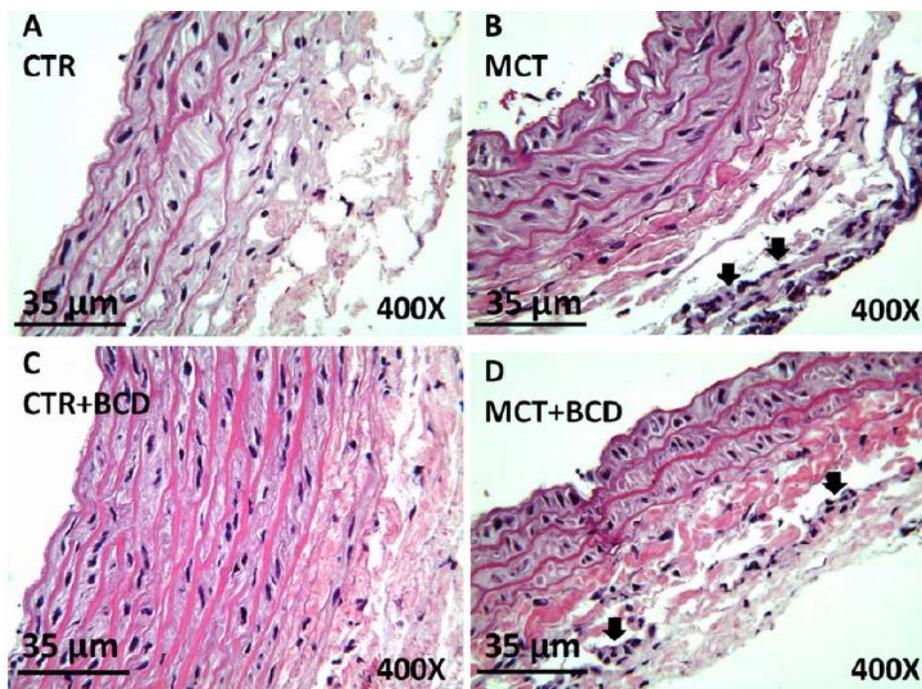


Fig. 7. Representative images of the pulmonary artery from rats receiving monocrotaline (60 mg/kg – i.p.) treated with a daily injection of either vehicle or bucindolol (2 mg/kg – i.p.) over 7 days. Samples were stained with hematoxylin and eosin and viewed under a light microscope for the identification of inflammatory cell infiltration. Infiltration of inflammatory cells in the pulmonary artery of an animal from the CTR group (A); MCT group (B); CTR + BCD group (C); and MCT + BCD group (D). 400 × magnification was used.

disease progression could also contribute to increased energy expenditure with a consequent body weight reduction [38]. This reduction in weight gain could result from a toxicity generated by the hepatic metabolism of monocrotaline, followed by pulmonary vascular endothelial cell injury [40] with a perivascular inflammatory response characterized by different degrees of inflammatory infiltrates, comprising mainly leukocytes, such as lymphocytes and macrophages [41]. Our results showed an increase in inflammatory infiltration in the pulmonary arteries of rats after receiving monocrotaline (MCT and MCT + BCD). Bucindolol was unable to attenuate the inflammatory infiltrate. Perros et al., [13] observed that nebivolol, a β -blocker, dramatically decreased macrophage accumulation in the lungs of PAH rats, due to a direct effect on immune cells. During the inflammatory process, agonists that act on endothelial cells can cause a series of post-translational modifications that may influence eNOS expression and activity, contributing to the loss of vascular wall function [42]. In our study, the decrease in eNOS expression correlated with an increase in inflammatory infiltrate, confirming that the inflammatory process has a role in the regulation of vasoactive compounds [43].

PAH is characterized by the imbalance between vasodilators and vasoconstrictors, such as decreased NO and increased ET-1 levels, respectively [1]. A decrease in the expression of pulmonary eNOS, observed in both monocrotaline groups (MCT and MCT + BCD), can lead to reduced levels of the vasodilator NO [44]. Previous studies have reported that eNOS levels were reduced in the lungs of rats with PAH, after 4 weeks of monocrotaline-injection [45,46]. Evidence suggests that elevated levels of ET-1 modulate the expression of eNOS, decreasing its production and NO availability [47]. There are also reports in literature showing that the activation of ET-1 receptors may lead to increased oxidative stress in the vasculature [48]. The ET-1 receptors, ETAR and ETBR, also play an important role in the progression of this

disease. ETAR is found in cardiac myocytes and smooth muscle cells, and its main action is vasoconstriction [49]. On the other hand, ETBR is present on endothelial cells and smooth muscle cells, exerting a dual effect on vascular tone. ETBR is mainly associated with the clearance of ET-1 and vasodilation, but also mediates smooth muscle cell proliferation [50]. Kuc et al., [52] demonstrated a significant increase in ETAR in the smooth muscle of small pulmonary arteries from patients with PAH, with no change in ETBR. In addition, in PAH, the mild vasodilator action of ETBR is lost and overwhelmed by potent sustained vasoconstriction [51]. In our study, the monocrotaline groups (MCT and MCT + BCD) showed increased ETAR and decreased ETBR expression in the lung tissue. These results suggest that an increase in ET-1 in lung tissue can stimulate the proliferation of the smooth muscle of arterioles and pulmonary arteries [50]. In the normal human lung, the ETAR/ETBR ratio is 30:70 [4]. The increase in the ETAR/ETBR ratio, observed in the monocrotaline groups (MCT and MCT + BCD), is associated with impaired vascular remodeling and increased PVR [52]. Indeed, in the rats treated with monocrotaline, we observed a significant increase in pulmonary artery wall thickness accompanied by an elevation of PVR. Previous studies have reported that bucindolol effects may be mediated by variations in the expression of gene of the endothelin system [53], and is also associated with a reduction in endothelin levels [54]. In our study, bucindolol treatment resulted in a protective effect on vascular remodeling. Bucindolol was able to attenuate the increase in the thickness of the pulmonary artery, possibly through modulation of the ETAR and, consequently, the ETAR/ETBR ratio. This could be the mechanism by which bucindolol reduces mean pulmonary artery pressure in rats with PAH as previously demonstrated by our group [11]. To explore and confirm this mechanism, additional evaluation methods are necessary to obtain consistent conclusions, such as the effect of an ETAR antagonist on vascular remodeling in this

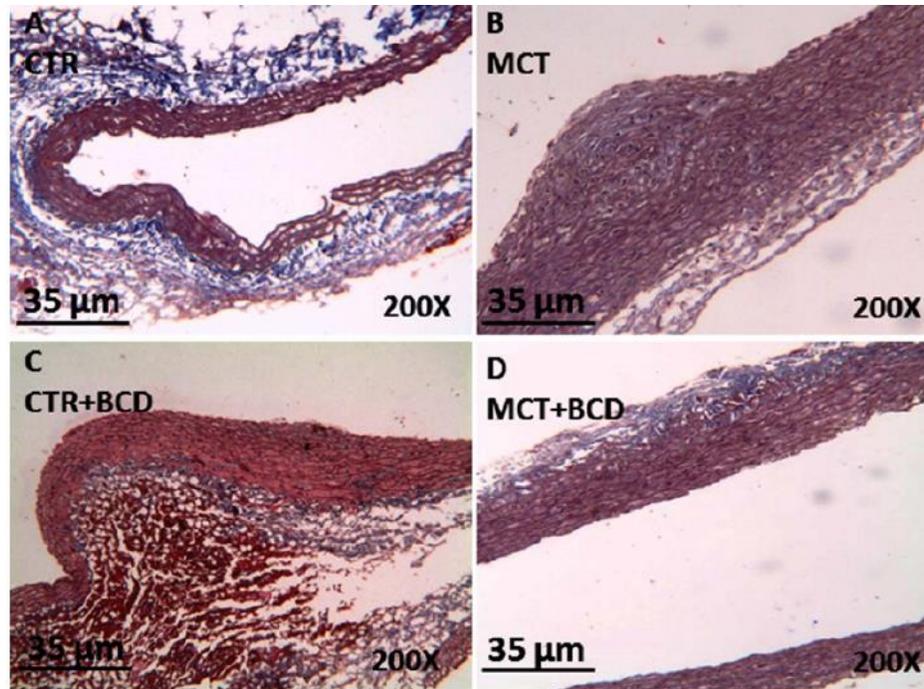


Fig. 8. Representative images of the pulmonary artery from rats receiving monocrotaline (60 mg/kg – i.p.) treated with a daily injection of either vehicle or bucindolol (2 mg/kg – i.p.) over 7 days. Samples were stained with hematoxylin and eosin and viewed under a light microscope for the determination of pulmonary artery thickness. Thickness of the pulmonary artery from the CTR group (A); MCT group (B); CTR + BCD group (C); and MCT + BCD group (D). 400 × magnification was used.

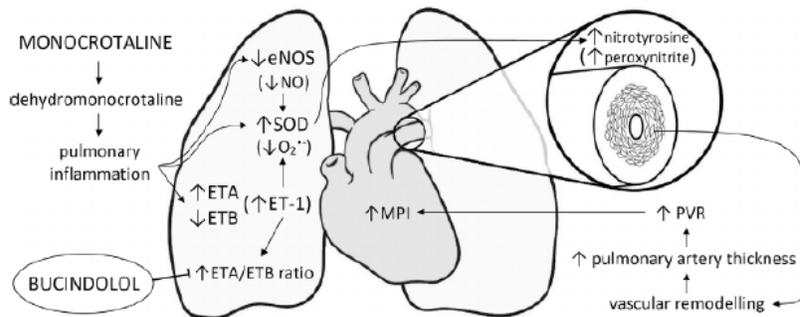


Fig. 9. Graphical abstract. Diagram depicting the signaling events involved in vascular remodeling of the pulmonary artery in bucindolol- or vehicle-treated rats with pulmonary arterial hypertension. The toxicity generated by dehydromonocrotaline, an active metabolite of monocrotaline, results in pulmonary vascular endothelial injury with inflammatory response. During this process, there is a sequence of post-translational modifications that influence eNOS and endothelin-1 receptor expression, leading to an imbalance between vasoactive compounds. The increase in the ETAR/ETBR ratio and nitrotyrosine levels are associated with impaired vascular remodeling and increased pulmonary vascular resistance followed by a subsequent increase of myocardial effort. Bucindolol was able to attenuate the increase in the thickness of the pulmonary artery,

possibly through modulation of the ETAR, as well as an increase in ETAR/ETBR ratio.

model.

It is known that the endothelial injury caused by monocrotaline is also associated with high levels of superoxide anions (O_2^-), resulting in the loss of redox balance and resultant oxidative stress [55]. Among the antioxidant defense mechanisms that metabolize O_2^- , SOD is the first line of defense [5]. SOD activity was increased in the MCT and MCT + BCD groups, which could lead to an increase in H_2O_2 , arising from the dismutation of O_2^- . Besides that O_2^- was not measured directly in the present paper, which is a limitation of our study, the increased SOD activity suggests that this ROS is increased in the monocrotaline animals. This increase of H_2O_2 in monocrotaline-treated animals has been previously demonstrated in different tissues [56,57]. CAT and GPx enzymes prevent the accumulation of H_2O_2 , promoting its catalysis to H_2O [58]. Elevations in lung GPx activity have been previously reported using monocrotaline [45]. In the present study, an

increase in GPx activity in the monocrotaline groups with no change in CAT activity and expression was observed. It is known that GPx is stimulated in the presence of mild oxidative stress, whereas CAT acts at higher concentrations of H_2O_2 [46]. Mild oxidative stress accompanied by increased GPx activity may have contributed to the non-elevation of lipoperoxidation in the monocrotaline groups (MCT and MCT + BCD). The treatment with bucindolol did not alter the activity and expression of antioxidant enzymes, as well as lipid peroxidation levels. This observation is consistent with previous reports that bucindolol may lack antioxidant properties [59]. Furthermore, bucindolol treatment was associated with a reduction in peroxynitrite levels as evaluated by measuring nitrotyrosine. Peroxynitrite is a product of the reaction of NO with O_2^- , which is a highly unstable oxidant, capable of activating growth factors and cytokines [60], leading to functional impairment of the airway epithelial cells [61]. Peroxynitrite also reduces

endothelium-dependent pulmonary artery relaxation, in addition to possessing a vasoconstrictor effect [62]. In this regard, there is a direct link between nitrotyrosine and vascular remodeling, contributing to increase in PVR. Bucindolol was able to reduce peroxynitrite production, as previously described [63], and this could also be a contributing factor in the reduction of PVR.

In 2011, Leichsenring-Silva and colleagues observed a correlation between the increase in pulmonary resistance and the increase of myocardial effort [64]. The MPI is used to measure the work performed by the heart for efficient pump functioning [65]. The MCT group presented an increase in PVR associated with high values in this index, demonstrating that animals must be in a decompensated stage of the disease. In addition to reducing PVR, bucindolol promoted a decrease of MPI (MCT + BCD group), suggesting less effort by the heart.

5. Conclusion

Bucindolol treatment was able to attenuate the increase in PVR, which is characteristic of monocrotaline-induced PAH. The beneficial effects induced by bucindolol treatment appear to result from a modulation of ETAR expression and subsequent improvement in pulmonary artery remodeling (Fig. 9).

Funding

This work was funded by the Research Agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Department of Foreign Affairs, Trade and Development (DFATD) - Program CAPES/DFATD, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Conflict of interest

None declared.

References

- Mathew, G.A. Zeballos, H. Tun, M.H. Gewirtz, Role of nitric oxide and endothelin-1 in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats, *Cardiovasc. Res.* 30 (1995) 739–746, [http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363\(95\)00108-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363(95)00108-5).
- P.J. Andrew, B. Mayer, Enzymatic function of nitric oxide synthases, *Cardiovasc. Res.* 43 (1999) 521–531, [http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00115-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00115-7).
- N.D. Tshilis, C.S. Oustwani, A.K. Vavra, Q. Jiang, L.K. Keefer, M.R. Kibbe, Nitric oxide inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia by increasing the ubiquitination and degradation of UbcH10, *cell. Biochem. Biophys.* 60 (2011) 89–97, <http://dx.doi.org/10.1007/s12013-011-9179-3>.
- J. Dupuis, M.M. Hoepfer, Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension, *Eur. Respir. J.* 31 (2008) 407–415, <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00078207>.
- S. Aggarwal, C. Gross, S. Sharma, J.R. Fineman, S.M. Black, Reactive oxygen species in pulmonary vascular remodeling, *Compr. Physiol.* 3 (2013) 1011–1034, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>.
- J.J. Ryan, G. Marsboom, S.L. Archer, Rodent models of group 1 pulmonary hypertension, *Handb. Exp. Pharmacol.* 218 (2013) 105–149, <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-38664-0-5>.
- P.R. Cheeke, Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids, *J. Anim. Sci.* 66 (1988) 2343–2350 PMID: 3049495.
- L. Brown, J. Miller, A. Dagger, C. Sernia, Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31 (1998) 108–115, <http://dx.doi.org/10.1097/00005344-199801000-00016>.
- L.C. Pan, M.W. Lamé, D. Morin, D.W. Wilson, H.J. Segall, Red blood cells augment transport of reactive metabolites of monocrotaline from liver to lung in isolated and tandem liver and lung preparations, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110 (1991) 336–346, [http://dx.doi.org/10.1016/S0041-008X\(05\)80016-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0041-008X(05)80016-X).
- D.W. Wilson, H.J. Segall, L.C.W. Pan, S.K. Dunston, Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats, *Microvasc. Res.* 38 (1989) 57–80, [http://dx.doi.org/10.1016/0026-2862\(89\)90017-4](http://dx.doi.org/10.1016/0026-2862(89)90017-4).
- B.G. de Lima-Seolin, R. Colombo, J.H.P. Bonetto, R.B. Teixeira, L.M. Donatti, K.R. Casali, A.E.G. Godoy, I.E. Litvin, P.C. Schenkel, A.S. da Rosa Araujo, A. Belló-Klein, Bucindolol improves right ventricular function in rats with pulmonary arterial hypertension through the reversal of autonomic imbalance, *Eur. J. Pharmacol.* 798 (2017) 57–65, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.12.028>.
- K. Okumura, H. Kato, O. Honjo, S. Breitling, W.M. Kuebler, M. Sun, M.K. Friedberg, Carvedilol improves biventricular fibrosis and function in experimental pulmonary hypertension, *J. Mol. Med.* 93 (2015) 663–674, <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-015-1251-9>.
- F. Perros, B. Ranchoux, M. Izikki, S. Bentebbal, C. Happé, F. Antigny, P. Jourdon, P. Dorfmueller, F. Lecerf, E. Fadel, G. Simonneau, M. Humbert, H.J. Bogaard, S. Eddahibi, Nebivolol for improving endothelial dysfunction, pulmonary vascular remodeling, and right heart function in pulmonary hypertension, *J. Am. Coll. Cardiol.* 65 (2015) 668–680, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2014.11.050>.
- N. Galis, M. Humbert, J.L. Vachiery, S. Gibbs, I. Lang, A. Torbicki, G. Simonneau, A. Peacock, A. Vonk Noordegraaf, M. Beghetti, A. Ghofrani, M.A. Gomez Sanchez, G. Hansmann, W. Klepetko, P. Lancellotti, M. Matucci, T. McDonagh, L.A. Pierard, P.T. Trindade, M. Zompatori, M. Hoeper, V. Abovans, A. Vaz Carneiro, S. Achenbach, S. Agewall, Y. Allanore, R. Asteggiano, L. Paolo Badano, J. Albert Barberà, H. Bouvaist, H. Bueno, R.A. Byrne, S. Carerj, G. Castro, Ç. Erol, V. Falk, C. Funck-Brentano, M. Gorenflo, J. Granton, B. Lung, D.G. Kiely, P. Kirchhof, B. Kjellstrom, U. Landmesser, J. Lekakis, C. Lionis, G.Y.H. Lip, S.E. Orfanos, M.H. Park, M.F. Piepoli, P. Ponikowski, M.P. Revel, D. Rigau, S. Rosenkranz, H. Völler, J. Luis Zamorano, ESC/ERS guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension, *Eur. Heart J.* 37 (2015) 67–119, <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehv317>.
- E. Black-Maier, B.A. Steinberg, J.P. Piccini, Bucindolol hydrochloride in atrial fibrillation and concomitant heart failure, *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 13 (2015) 627–636, <http://dx.doi.org/10.1586/14779072.2015.1031111>.
- M.R. Bristow, β -adrenergic receptor blockade in chronic heart failure, *Circulation* 101 (2000) 558–569, <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.101.5.558>.
- M.R. Bristow, G.A. Murphy, H. Krause-Steinrauf, J.L. Anderson, J.F. Carlquist, S. Thaneemit-Chen, V. Krishnan, W.T. Abraham, B.D. Lowe, J.D. Port, G.W. Davis, L.C. Lazzaroni, A.D. Robertson, P.W. Lavori, S.B. Liggett, An α 2C-adrenergic receptor polymorphism alters the norepinephrine-lowering effects and therapeutic response of the β -blocker bucindolol in chronic heart failure, *Circ. Heart Fail.* 3 (2010) 21–28, <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.885962>.
- F. Farahmand, M.F. Hill, P.K. Singal, Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale, *Mol. Cell. Biochem.* 260 (2004) 21–29, <http://dx.doi.org/10.1023/B:MCBL.0000026047.48534.50>.
- J.G. Baker, P. Kemp, J. March, L. Fretwell, S.J. Hill, S.M. Gardiner, Predicting in vivo cardiovascular properties of β -blockers from cellular assays: a quantitative comparison of cellular and cardiovascular pharmacological responses, *FASEB J.* 25 (2011) 4486–4497, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.11-192435>.
- D. Urbaniene, I. Haber, Y.H. Fang, T. Thenappan, S.L. Archer, Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension, *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 299 (2010) L401–412, <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00114.2010>.
- L.G. Rudski, W.W. Lai, J. Afilalo, L. Hua, M.D. Handschumacher, K. Chandrasekaran, S.D. Solomon, E.K. Louie, N.B. Schiller, Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American society of echocardiography, *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 23 (2010) 685–713, <http://dx.doi.org/10.1016/j.echo.2010.05.010>.
- F.C. Yin, H.A. Spurgeon, K. Rakusan, M.L. Weisfeldt, E.G. Lakatta, Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat, *Am. J. Physiol.* 243 (1982) H941–947.
- R.D. Lillie, H.M. Fullmer, *Histologic Technique and Practical Histochemistry* 4 McGraw-Hill, New York, 1976.
- R. Colombo, R. Siqueira, A. Conzatti, B.G. de Lima-Seolin, T.R.G. Fernandes, A.E.G. Godoy, I.E. Litvin, J.M.A. Silva, P.J.F. Tucci, A.S.R. Araujo, A. Belló-Klein, Exercise training contributes to H₂O₂/VEGF signaling in the lung of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension, *Vasc. Pharmacol.* 87 (2016) 49–59, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2016.06.006>.
- O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the olin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275, [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4).
- D.L. Drabkin, J.H. Austin, Spectrophotometry of HbNO and SHb, *J. Biol. Chem.* 112 (1935) 51–65.
- S. Marklund, G. Marklund, Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *Eur. J. Biochem.* 47 (1974) 469–474, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>.
- H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126, [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- L. Flohé, W.A. Günzler, Assays of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 114–120, [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05015-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05015-1).
- H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* 95 (1979) 351–358, [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
- U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685, <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>.
- A.S.R. Araujo, M.F.M. Ribeiro, A. Enzweiler, P. Schenkel, T.R.G. Fernandes, W.A. Partata, M.C. Irigoyen, S. Liesuy, A. Belló-Klein, Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism, *Mol. Cell. Endocrinol.* 249 (2006) 133–139, <http://dx.doi.org/10.1007/s11269-006-4635-3>.
- P. Jansa, J. Jarkovsky, H. Al-Hiti, J. Popelova, D. Ambroz, T. Zatočil, R. Votavova, P. Polacek, J. Maresova, M. Aschermann, P. Brabec, L. Dusek, A. Linhart, Epidemiology and long-term survival of pulmonary arterial hypertension in the Czech republic: a retrospective analysis of a nationwide registry, *BMC Pulm. Med.*

- 14 (2014) 14–45, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2466-14-45>.
- [34] A.J. Peacock, N.F. Murphy, J.J. McMurray, L. Caballero, S. Stewart, An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension, *Eur. Respir. J.* 30 (2007) 104–109, <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00092306>.
- [35] M. Clozel, P. Hess, M. Rey, M. Iglarz, C. Binkert, C. Qiu, Bosentan, sildenafil, and their combination in the monocrotaline model of pulmonary hypertension in rats, *Exp. Biol. Med.* 231 (2006) 967–973 PMID: 16741032.
- [36] A.R. Ludke, F. Mosele, R. Caron-Lienert, M.F. Ribeiro, W. Partata, S. Liesuy, A.S. Araujo, P. Singal, A. Belló-Klein, Modulation of monocrotaline-induced cor pulmonale by grape juice, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 55 (2010) 89–95, <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181c87a9d>.
- [37] R. Colombo, R. Siqueira, C.U. Becker, T.G. Fernandes, K.M. Pires, S.S. Valença, M.P. Souza-Rabbo, A.S. Araujo, A. Belló-Klein, Effects of exercise on monocrotaline-induced changes in right heart function and pulmonary artery remodeling in rats, *can, J. Physiol. Pharmacol.* 91 (2013) 38–44, <http://dx.doi.org/10.1139/cjpp-2012-0261>.
- [38] M.P.K.J. Engelen, Nutrition and metabolism in chronic respiratory disease, *Eur. Resp. Mon.* 24 (2003) 23–33.
- [39] K. Leineweber, T. Seyfarth, O.E. Brodde, Chamber-specific alterations of norepinephrine uptake (uptake(1)) in right ventricles of monocrotaline-treated rats, *Br. J. Pharmacol.* 131 (2000) 1438–1444, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0703698>.
- [40] L.J. McNabb, K.M. Baldwin, Hemodynamic and metabolic effects of exercise in crotonalaria-induced pulmonary hypertension in rats, *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* 57 (1984) 1829–1833.
- [41] M. Rabinovitch, C. Guignabert, M. Humbert, M.R. Nicolls, Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension, *Circ. Res.* 115 (2014) 165–175, <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.113.301141>.
- [42] F. Desjardins, J.P. Gratton, Post-translational regulation of eNOS activity in inflammation, in: S. Dauphinee, A. Karsan (Eds.), *Endothel. Dysfunct. Inflamm.*, Springer, Basel, 2010, pp. 65–80, http://dx.doi.org/10.1007/978-3-0346-0168-9_4.
- [43] D.J. Lefler, Statins as potent antiinflammatory drugs, *Circulation* 106 (2002) 2041–2042, <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000033635.42612.88>.
- [44] A. Giaid, D. Saleh, Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension, *N. Engl. J. Med.* 333 (1995) 214–221, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199507273330403>.
- [45] H.F. Jin, S.X. Du, X. Zhao, H.L. Wei, Y.F. Wang, Y.F. Liang, C.S. Tang, J.B. Du, Effects of endogenous sulfur dioxide on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats, *Acta Pharmacol. Sin.* 29 (2008) 1157–1166, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00864.x>.
- [46] V.L. Lushchak, Classification of oxidative stress based on its intensity, *Excl J.* 13 (2014) 922–937 PMID: 26417312.
-
- [47] Y. Chen, R.M. McCarron, S. Golech, J. Bembry, B. Ford, F. a Lenz, N. Azzam, M. Spatz, ET-1- and NO-mediated signal transduction pathway in human brain capillary endothelial cells, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 284 (2003) C243–C249, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00305.2002>.
- [48] J.S. Pollock, D.M. Pollock, Endothelin, nitric oxide, and reactive oxygen species in diabetic kidney disease, *Contrib. Nephrol.* 172 (2011) 149–159, <http://dx.doi.org/10.1159/000329054>.
- [49] B. Seo, B.S. Oemar, R. Siebenmann, L. Von Segesser, T.F. Lüscher, Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels, *Circulation* 89 (1994) 1203–1208, <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.89.3.1203>.
- [50] T. Fukuroda, T. Fujikawa, S. Ozaki, K. Ishikawa, M. Yano, M. Nishikibe, Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199 (1994) 1461–1465, <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1994.1395>.
- [51] S. Sauvageau, E. Thorin, A. Caron, J. Dupuis, Endothelin-1-induced pulmonary vasoreactivity is regulated by ET A and ETB receptor interactions, *J. Vasc. Res.* 44 (2007) 375–381, <http://dx.doi.org/10.1159/000102534>.
- [52] R.E. Kuc, M. Carlebur, J.J. Maguire, P. Yang, L. Long, M. Toshner, N.W. Morrell, A.P. Davenport, Modulation of endothelin receptors in the failing right ventricle of the heart and vasculature of the lung in human pulmonary arterial hypertension, *Life Sci.* 118 (2014) 391–396, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.02.020>.
- [53] M.R.G. Taylor, D. Slavov, K. Humphrey, L. Zhao, J. Cockcroft, X. Zhu, P. Lavori, M.R. Bristow, L. Mestroni, L.C. Lazzeroni, Pharmacogenetic effect of an endothelin-1 haplotype on response to bucindolol therapy in chronic heart failure, *Pharmacogenet. Genomics.* 19 (2009) 35–43, <http://dx.doi.org/10.1097/FPC.0b013e3181c87a9d>.
- [54] R.P. Frantz, B.D. Lowes, P.A. Grayburn, M. White, H. Krause-Steinrauf, V. Krishnan, L. Uyeda, J.C. Burnett, Baseline and serial neurohormones in patients with congestive heart failure treated with and without bucindolol: results of the neurohumoral substudy of the Beta-blocker evaluation of survival study (BEST), *J. Card. Fail.* 13 (2007) 437–444, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardfail.2007.03.007>.
- [55] V.G. Demarco, A.T. Whaley-Connell, J.R. Sowers, J. Habibi, K.C. Dellsparger, Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension, *World J. Cardiol.* 2 (2010) 316–324, <http://dx.doi.org/10.4330/wjc.v2.i10.316>.
- [56] F. Mosele, A.M.V. Tavares, R. Colombo, R. Caron-Lienert, A.S.R. Araujo, M.F. Ribeiro, A. Belló-Klein, Effects of purple grape juice in the redox-sensitive modulation of right ventricular remodeling in a pulmonary arterial hypertension model, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 60 (2012) 15–22, <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.0b013e3182550f66>.
- [57] R. Colombo, R. Siqueira, A. Conzatti, T. Regina, G. Fernandes, A. Maria, V. Tavares, A. Sander, A. Belló-klein, Aerobic exercise promotes a decrease in right ventricle apoptotic proteins in experimental cor pulmonale, *J. Cardiovas Pharmacol.* 66 (2015) 246–253, <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.0000000000000272>.
- [58] B.P. Yu, Cellular defenses against damage from reactive oxygen species, *Physiol. Rev.* 74 (1994) 139–162 PMID: 8295932.
- [59] S.S. Gottlieb, Are all beta-blockers the same for chronic heart failure? *Curr. Cardiol. Rep.* 3 (2001) 124–129 PMID: 26417312.
- [60] P. Pachter, J.S. Beckman, L. Liaudet, Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease, *Physiol. Rev.* 87 (2007) 315–424, <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>.
- [61] J.D. Lang, P.J. McArdle, P.J. O'Reilly, S. Matalon, Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury, *Chest* 122 (2002) 314S–320S, <http://dx.doi.org/10.1378/chest.122.6>.
- [62] J. Belik, R.P. Jankov, J. Pan, A.K. Tanswell, Peroxynitrite inhibits relaxation and induces pulmonary artery muscle contraction in the newborn rat, *Free. Radic. Biol. Med.* 37 (2004) 1384–1392, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.07.029>.
-
- [63] R.P. Mason, R. Kubant, R. Jacob, A. Jacoby, J.D. Port, M.R. Bristow, T. Malinski, Effects of bucindolol enantiomers on nitric oxide and peroxynitrite release from endothelial cells in ethnic populations, *J. Card. Fail.* 14 (2008) S78, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardfail.2008.06.433>.
- [64] F. Leichsenring-Silva, A.M.V. Tavares, F. Mosele, B. Berger, S. Liesuy, A. Belló-Klein, Association of the time course of pulmonary arterial hypertension with changes in oxidative stress in the left ventricle, *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* 38 (2008) 804–810, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05608.x>.
- [65] N. Kakouros, S. Kakouros, J. Lekakis, I. Rizos, D. Cokkinos, Tissue doppler imaging of the tricuspid annulus and myocardial performance index in the evaluation of right ventricular involvement in the acute and late phase of a first inferior myocardial infarction, *Echocardiography* 28 (2011) 311–319, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1540-8175.2010.01318.x>.

ANEXO B – ARTIGO *IN VITRO***Oxidative Medicine and Cellular Longevity****Bucindolol attenuates cardiac remodeling by modulating oxidative stress in H9c2 cardiac cells exposed to norepinephrine**

Bruna Gazzi de Lima-Seolin^{1,3}, Ashley Nemeck-Bakk², Heidi Forsyth³, Stefanie Kirk², Alex Sander da Rosa Araujo¹, Paulo Cavalheiro Schenkel¹, Adriane Belló-Klein¹ and Neelam Khaper^{2,3}

1 Laboratory of Cardiovascular Physiology and Reactive Oxygen Species, Institute of Basic Health Science (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre / 90050-170, Brazil.

2 Department of Biology, Lakehead University, Thunder Bay / ON P7B 5E1, Canada.

3 Medical Sciences Division, Northern Ontario School of Medicine (NOSM), Lakehead University, Thunder Bay, ON P7B 5E1, Canada.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the action of bucindolol, a β -blocker/sympatholytic agent, on hypertrophy, cell survival and death signaling pathways in H9c2 cardiac cells exposed to norepinephrine. H9c2 cells were incubated with 10 μ M norepinephrine for 24 h in the presence or absence of bucindolol (10 μ M) treatment for 8 h. Western blotting was used to determine the expression of proteins for hypertrophy/survival and death signaling pathways. Flow cytometry was used to assess cell death via caspase-3/7 activity and propidium iodide, and reactive oxygen species via DCF assay. Norepinephrine exposure resulted in an increase in oxidative stress and cell death as measured by apoptosis, and necrosis assay. This was accompanied by an increase in autophagy. The protein kinase B/mammalian target of rapamycin (Akt/mTOR) pathway which is involved in pro-survival cellular processes including autophagy and hypertrophy was activated in response to norepinephrine and was mitigated by bucindolol. In conclusion bucindolol was able to attenuate cardiac remodeling which is mediated by oxidative stress.

Keywords: Apoptosis, Autophagy, Bucindolol, Norepinephrine, Oxidative stress.

1 INTRODUCTION

Heart failure (HF) is a global pandemic, affecting about 26 million people around the world [1]. Pathologic cardiac remodeling in response to hemodynamic overload and cardiac injury is associated with the activation of the neuroendocrine system and an increase in oxidative stress and inflammation eventually leading to cardiac dysfunction [2]. The activation of the neuroendocrine system stimulates intracellular signaling pathways causing hypertrophy and fibrosis, activation of metalloproteinases, and increase of oxidative stress leading to cell death by necrosis or apoptosis. This process is a key step in the development of maladaptive hypertrophy, initiated by an imbalance between pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins [3]. Thus, the heart progresses from compensatory phase of adaptive hypertrophy, to dilation with decreased performance [4]. Therefore blockage of the sympathetic system has an important role in attenuation of cardiac remodeling in response to injury [5,6]. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) is an important transcriptional factor that regulates cell proliferation, apoptosis, and cardiac hypertrophy. Cardiac STAT3 levels are dynamic and acts as a sensor of both acute and chronic stress to protect against oxidative damage or cell death signaling [7].

Despite the key beneficial role of autophagy in physiologic cardiac remodeling, excessive or insufficient autophagy has been reported to contribute to adverse cardiac remodeling [8]. Cardiac autophagy has been reported to play an important role in response to increased norepinephrine levels [9]. Under nutrient-rich conditions, the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) / protein kinase B (Akt) / mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade contributes to inhibiting autophagy. Whereas, under stress condition, inhibition of mTOR caused by 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activates

autophagy, causing the conversion of the microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3-I) to LC3-II, essential for the formation of autophagosomes [10].

Bucindolol is a non-selective β -adrenergic blocker (β 1-, β 2-blocker) with vasodilatory properties by α 1-antagonism [11] and mild sympatholytic effects [12]. We have previously demonstrated that bucindolol treatment improved right ventricle (RV) systolic function, reduced RV pleomorphism, necrosis, fibrosis, decreased infiltration of inflammatory cells, as well as decreased the sympathetic drive and balance and myocardial effort in rats with pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline [13]. Furthermore, bucindolol has also been reported to improve left ventricular systolic and diastolic function in humans [14].

Despite evidence showing cardiovascular benefits of bucindolol, its exact role in cardiac remodeling is still not fully known. In the current study, we explored the role of bucindolol in the signaling for cell hypertrophy/survival and apoptosis / autophagy pathways, in H9c2 cardiac cells exposed to norepinephrine.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Cell culture

Rat cardiac cells (H9c2) (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10 % (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS) (HyClone Laboratories, Pittsburgh, PA, USA) and 1 % antibiotic-antimycotic (100 X) (10,000 U / ml of penicillin, streptomycin 10,000 μ g / ml of streptomycin, 25 μ g / ml of Gibco Amphotericin B) (Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and incubated at 37 °C with 5 % CO₂

and 100 % humidity. To maintain the cell culture, medium was changed every 2- to 3-days and cells were passaged when they reached 75 - 80 % confluence. Cells were seeded at: 1×10^4 cells / well for the MTT assay; 1×10^5 cells / mL for analysis on the flow cytometry, and 1×10^6 cells / T-75 flask for Western blotting.

2.2 Treatment conditions

Four treatment conditions were established: 1) H9c2 cells that were not exposed to norepinephrine or bucindolol (CTL); 2) H9c2 cells exposed to norepinephrine (NE); 3) H9c2 cells incubated with bucindolol (CTL+BCD); and 4) H9c2 cells exposed to norepinephrine and bucindolol treatment (NE+BCD). The concentration of norepinephrine was determined by the MTT cell viability assay, where H9c2 cells were incubated with different concentrations of norepinephrine (2, 5 and 10 μ M) at two different time points (24 and 36 h). Based on the results, 10 μ M of norepinephrine for 24 h was used for subsequent experiments. Norepinephrine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was diluted in 0.5 M HCl (0.03 %) and incubation was done in FBS- and antibiotic-antimycotic-free culture medium. Subsequently, H9c2 cells were treated for 8 h with bucindolol (10 μ M) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), prepared in 0.01 % DMSO (Dimethyl Sulfoxide; Fisher Scientific, Ottawa, ON, CA).

2.3 Protein expression

Western blotting was used to analyze the immunocontent of different signaling proteins. H9c2 cells were lysed in PathScan lysis buffer (25mmol/L Tris pH = 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% Triton-X 100), and protease inhibitors, using the Qiagen Tissue Lyser. Samples were centrifuged at 8000 g for 10 minutes at 4°C and supernatants

were collected, and the protein concentration was quantified using the DC protein assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, CA). Thirty micrograms of protein sample was subjected to SDS-page gel electrophoresis (7 – 15 % according to the size of the proteins of interest), and electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane using a Trans-blot apparatus (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, CA). The membrane was blocked with 5 % non-fat milk in Tris buffer saline (20 mM Tris, 137 mM NaCl) for 1 h at room temperature, and then incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: 4-HNE (1:500), phospho-Akt (1:2000), Akt (1:250), phospho-AMPK α (1:1000), AMPK α (1:250), phospho-mTOR (1:1000), mTOR (1:1000), LC3B-I / II (1:500), p70 S6 Kinase (1:1000), PI3 Kinase p85- α (pTyr⁶⁰⁷) (1:500), phospho-STAT3 (1:1000), STAT3 (1:1000). All antibodies were purchased from Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA), except: 4-HNE (Abcam, Cambridge, MA, USA), and PI3K (Millipore, Bedford, MA, USA). The bound primary antibodies were detected with anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:1000 – 1:5000) and were normalized to β -actin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Chemiluminescence reaction was detected by ChemiDoc XRS System, supported by Quantity One software version 4.6.5 (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, CA), which were analyzed by ImageJ software (Wayne Rasband, Research Services Branch, NIH, Bethesda, MD, USA).

2.4 Apoptosis assay

Apoptosis of H9c2 cells was measured by the presence of active caspase-3/7, detected by flow cytometry (FACSCalibur Flow Cytometer; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) using the CaspaTag Caspase-3/7 *In Situ* Assay Kit (Chemicon International, Temecula, CA,

USA), according to the manufacturer's instructions. Active caspase-3/7 positive cells were assessed on the basis of the fluorescence after incubation with Fluorochrome Inhibitors of Caspases (FLICA) reagent [15]. 10,000 events were acquired per trial and the data were expressed as fluorescence intensity in the M2 area of the histogram. The activity of caspase-3/7 was expressed as the mean fluorescence intensity.

2.5 Cell death by propidium iodide

Cell death was assessed via flow cytometric analysis of H9c2 cells incubated with propidium iodide (PI) solution (250 $\mu\text{g} / \text{mL}$) (Millipore, Bedford, MA, USA) for 10 min. PI is membrane impermeable in live cells but binds to DNA of dead cells due to loss of cell membrane integrity, causing increase in the fluorescence. For the analysis, the percentage of PI positive cells was determined using a FACSCalibur Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) (10,000 events) [16].

2.6 Reactive oxygen species (ROS) assay

Intracellular reactive oxygen species (ROS) level was assessed by incubating H9c2 cells with CM-H₂DCFDA (5-[and-6]-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester) (Molecular Probes; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 30 min. After this incubation period, the dye solution was removed by aspiration, and the cells were trypsinized and centrifuged at 500 $\times g$ for 5 minutes at 4 °C. The samples were analyzed by flow cytometry. To analyze the quantity of ROS produced, we measured the fluorescence of CM-H₂DCFDA at 488 nm on the FL1 channel of a BD FACSCalibur Flow Cytometer (BD Biosciences) supported by BD CellQuest Pro Software (BD Biosciences, San Jose, CA,

USA) [15]. Fluorescence was expressed as mean fluorescence, after 10,000 events were acquired per trial.

2.7 Statistical analysis

All statistical analyses were performed using Sigma Plot software (Version 12.0, Systat Software Inc., San Jose, USA). Normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. Comparisons between groups were performed by two-way ANOVA, with a Student-Newman-Keuls post-hoc test. Differences between groups were considered statistically significant when $P < 0.05$.

3 RESULTS

3.1 Signaling protein expression

To analyze the hypertrophy and survival signaling pathways the immunocontent of the proteins mentioned below was performed. With regards to the transcription factor STAT3, there was a marked increase (32 %) in its activity in NE condition compared to CTL condition (Figure 1A). Bucindolol was effective in attenuating (39%) this increase in the NE+BCD condition. The activity of the proteins kinases PI3K (Figure 1B) and Akt (Figure 1C), was found to be significantly increased (73 % and 56 %, respectively) in NE condition in comparison to CTL condition. Bucindolol was efficient in mitigating this increase; as NE+BCD demonstrated a 27 % decrease in PI3K expression and 38 % decrease in Akt activity when compared to NE condition. Moreover, there was an increase in mTOR activity (30%) in NE condition as compared to CTL condition, and bucindolol treatment did not alter mTOR activity (Figure 1D). However, p70 S6 Kinase (P70 S6K) expression was significantly higher (123 %) in the NE condition when compared to CTL condition, and

NE+BCD condition showed a decrease (32 %) in P70 S6K activity in relation to NE condition (Figure 1E). Similarly, we found an increase in AMPK activity (52 %) in NE condition when compared to CTL condition (Figure 1F). Moreover, NE+BCD demonstrated a reduction of 48 % in AMPK activity in relation to NE condition.

The LC3-II / I ratio which reflects the autophagic activity was significantly up regulated in norepinephrine conditions (NE and NE+BCD) as compared to control conditions (CTL and CTL+BCD). Furthermore, NE+BCD condition showed an increase of 35 % in this ratio when compared to NE condition (Figure 1G).

3.2 Apoptosis

A significant increase in active caspases-3/7 was evident in NE condition in comparison to CTL condition. Bucindolol was able to reduce (66%) this activity in NE+BCD condition when compared to NE condition (Figures 2A and 2B).

3.3 Cell death by propidium iodide

No significant differences in necrosis were found between CTL and NE conditions. However, NE+BCD decreased (60 %) the PI uptake when compared to NE condition (Figures 3A and 3B).

3.4 Oxidative stress

Intracellular ROS measured by the DCFH-DA assay are shown in Figure 4A and 4B. No significant differences in oxidative stress was observed between CTL and NE conditions.

However, NE+BCD condition demonstrated a significant reduction (34 %) of the ROS in relation to NE condition.

Furthermore, bucindolol was effective in mitigating the increase in lipid peroxidation caused by norepinephrine, as NE condition showed an increase (44 %) in 4-HNE expression when compared to CTL condition and NE+BCD condition demonstrated a decrease (20 %) in the protein expression in relation to NE condition (Figure 5).

4 DISCUSSION

In the present study, we have demonstrated that bucindolol, a non-selective β -blocker/sympatholytic agent, attenuated hypertrophy and apoptosis in an *in vitro* model of norepinephrine-induced cardiac damage, and this was associated with reduced oxidative stress.

Chronic stress results in prolonged cardiac exposure to norepinephrine, which through the activation of the α - and β -adrenergic receptors induces changes in cardiac function and structure, such as hypertrophy, which is an initial step of cardiac remodeling and eventually triggering cell death which represents the initial stage of heart failure [17]. Thus, the *in vitro* model of norepinephrine-stimulated cardiomyocytes is relevant and appropriate for assessing the cardioprotective potential of drugs against damage caused by the over activation of the sympathetic nervous system [18].

Based on cell viability data (not shown) we chose 10 μ M norepinephrine for 24 h in the presence and absence of 10 μ M of bucindolol for 8 hours to investigate the effect of bucindolol on markers of apoptosis, cell survival, and oxidative stress.

The activation of adrenergic receptor induced by norepinephrine is a primary mediator of cardiac hypertrophy. STAT3 is an important transcription factor that regulates

cell differentiation, proliferation and apoptosis [19], and is known to be directly activated in cardiomyocytes by β -adrenergic agonists [20]. Kishore and Verma (2012) have reported that STAT3 signaling is activated during physiological hypertrophy and inhibited under chronic pathological conditions [21]. Other studies have demonstrated that persistent STAT3 activation promote uncontrolled growth and survival through altered gene expression [22], leading to pathologic cardiac hypertrophy [20]. Our results showed an increase in STAT3 activity in the NE condition, which was reversed in the NE+BCD condition by bucindolol treatment. Our study is the first to report that bucindolol decreases STAT3 activity. The adrenergic receptor induced cardiac hypertrophy response usually involves activation of members of the MAPK family as well as PI3K / Akt pathway. The action of norepinephrine on the α -adrenergic receptor in the heart results in the activation of phospholipase C and formation of inositol triphosphate (IP3) and 1,2-diacylglycerol (DAG). Subsequently, DAG stimulates cytosolic protein kinases activity, resulting in increased protein synthesis and development of hypertrophy [23]. Through this signaling cascade, PI3K is activated, leading to recruitment and activation of Akt. PI3K / Akt signaling is essential for conferring cardioprotection in response to stimuli and it activates STAT3. Phosphorylated STAT3 is linked to activation of Akt and this pathway is involved in cell proliferation and cell growth. Numerous Akt targets are involved in cardiac remodeling, including mTOR. When activated by Akt, mTOR phosphorylates p70 S6K, which plays a key role in the stimulation of protein synthesis in the heart [24]. It is known that the activity of these pathways is involved in the progression of cardiac hypertrophy to HF [25]. In our study, we found an increase in the activity of PI3K, Akt, and mTOR in the NE condition, as well an increased expression of the p70 S6K. Thus, our results show evidence of cardiac hypertrophy in the NE condition, also demonstrating the reproducibility of the model. Bucindolol treatment resulted in a decrease

in the activity and expression of these hypertrophy markers. Similarly, Pönicke *et al.* (2002) has reported that in rat ventricular cardiomyocytes, bucindolol inhibited norepinephrine-induced protein synthesis [26].

PI3K / Akt / mTOR signaling pathway has an important role in regulating proliferation, cell growth, transcription of cellular metabolites such as antioxidants, apoptosis, and autophagy [25]. Cardiac autophagy plays an important role in the turnover of damaged macromolecules and organelles, which is key in maintaining cellular homeostasis. Excessive autophagy is observed in the damaged cells, which may be a trigger for cardiac apoptosis. During autophagy damaged organelles and proteins are degraded in the autolysosome. Autophagy is initiated by phosphorylation of AMPK, which inhibits mTOR [27]. This signaling pathway converges to the cleavage and conversion of the cytosolic precursor LC3-I into LC3-II, which is essential for membrane extension, curvature and closure of autophagosomes [10]. In our study, NE condition demonstrated up-regulation of the AMPK / mTOR pathway and increased LC3-II / LC3-I ratio. Previous studies have reported that STAT3 inhibited autophagy via inhibition of oxidative stress [28]. Xu *et al.* (2007) also demonstrated a significant increase in AMPK activity in norepinephrine-treated H9c2 cells, caused by the stimulation of α 1-adrenergic receptor [29]. In the NE+BCD condition, we observed an increase in mTOR activity and LC3-II / LC3-I ratio. In our study, the increase in autophagy in the norepinephrine conditions groups, demonstrate an uncompensated state. Recent literature suggest that the persistent adrenergic hyperstimulation that triggers autophagy in cardiac cells could contribute to reduce the deleterious effects of norepinephrine, acting as a cytoprotective response against apoptosis in cardiac myocytes [9,30]. Thus, it can be proposed that the increased autophagy found in

the norepinephrine conditions (NE and NE+BCD) is beneficial, eliminating damaged and potentially toxic proteins.

While limited adrenergic stimulation causes myocyte hypertrophy, adrenergic overdrive contributes to myocyte loss because of altered anti-apoptotic Bcl-2 protein expression. When coupled with the Gi protein, activation of the β_2 receptor is responsible for anti-apoptotic action [6]. It is known that cardiomyocytes predominantly express β_1 , and thus, the hyperactivation of these receptors have an important role not only in ventricular remodeling but also in the induction of apoptosis [31]. It is known that the imbalance between Bax/Bcl-2 is responsible in changing the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$), generating the opening of mitochondrial membrane pores, with subsequent activation of the caspases [14,15]. A significant increase of activation of effectors caspases-3/7 was evident in NE condition in relation to CTL and NE+BCD conditions. In healthy cells, the caspases reside in the cytosol as latent zymogens. Its activation is achieved by autoactivation, transactivation or proteolysis [33]. We have clearly demonstrated that while adrenergic hyperstimulation by norepinephrine results in apoptosis, bucindolol has antiapoptotic action, since the activation of the caspases-3/7 is its final target. To confirm the cytoprotection of bucindolol in cell death pathways, PI assessment was performed. Bucindolol significantly reduced the number of dead cells in the NE+BCD condition compared to the NE condition.

ROS production is an event in the pathway in which α_1 -adrenergic receptor modulates cardiac hypertrophy. Moreover oxidative stress inhibits canonical STAT3 transcriptional activity. Activated STAT3 induces expression of antiapoptotic and antioxidative stress genes. In a recent study, Saleen and Goswami *et al.* (2017) demonstrated that the activation of cardiac adrenergic receptors by norepinephrine co-stimulated the generation of Nox2, leading to the production of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) [34]. Increase in

oxidative stress leads to lipid peroxidation, which modify cell integrity through changes in permeability of the cell membrane [35]. 4-HNE is the stable by product of lipid peroxidation causing changes in cell signaling, protein, and DNA damage and inducing apoptosis by activation of the caspases [36]. Moreover, PI3K-mediated cell survival pathway is known to protect against 4-HNE mediated oxidative damage [37]. NE+BCD condition showed a decrease in the ROS formation and 4-HNE, in comparison to NE condition, further supporting its cardioprotective action.

5 CONCLUSION

Bucindolol treatment was able to prevent the increase in cardiac hypertrophy and apoptosis, characteristic of heart diseases with sympathetic hyperactivity. The beneficial effects induced by bucindolol treatment appeared to be due to modulation of ROS generation and oxidative damage, and subsequent reversal of cardiac hypertrophy and apoptosis.

FUNDING

This work was funded by the Brazilian Research Agencies: Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Program CAPES/DFADT, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), as well as the Northern Ontario School of Medicine (NOSM) Faculty Association Research Development Funds.

AUTHORS CONTRIBUTION

Data collection, analysis and writing the first draft: Lima-Seolin BG de. Design of the study and supervised the research: Khaper N and Belló-Klein A. Flow cytometry data acquisition: Lima-Seolin BG de, Nemec-Bakk A, Fostyth H, Kirk S. Critical revision of the manuscript for the intellectual content: Araujo AS, Schenkel PC, Belló-Klein A, and Khaper N. Supervision / as the major investigator: Khaper N.

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

REFERENCES

- [1] G. Savarese, L.H. Lund, Global Public Health Burden of Heart Failure, *Card Fail Rev.* (2017), 3(1):7-11. doi:10.15420/cfr.2016.
- [2] M. Chiong, Z.V. Wang, Z. Pedrozo et al., Cardiomyocyte Death: Mechanisms and Translational Implications, *Cell Death Dis.* (2011), 2:e244. doi:10.1038/cddis.2011.130.
- [3] J.E. Chipuk, T. Moldoveanu, F. Llambi et al., The BCL-2 Family Reunion, *Mol Cell.* (2010), 37(3):299-310. doi:10.1016/j.molcel.2010.01.025.
- [4] H. Zhu, P. Tannous, J.L. Johnstone et al., Cardiac Autophagy is a Maladaptive Response to Hemodynamic Stress, *J Clin Invest.* (2007), 117(7):1782-1793. doi:10.1172/JCI27523.
- [5] C. Communal, W.S. Colucci, The Control of Cardiomyocyte Apoptosis via the Beta-adrenergic Signaling Pathways, *Arch Mal Coeur Vaiss* (2005), 98(3):236-241. PMID: 15816327.
- [6] S.Y. Shin, T. Kim, H.S. Lee et al., Switching Role of β -adrenergic Receptor Signalling in Cell Survival or Death Decision of Cardiomyocytes, *Nat Commun.* (2014), 5:5777. doi:10.1038/ncomms6777.
- [7] A. Haghikia, B. Stapel, M. Hoch et al., STAT3 and cardiac remodeling, *Heart Fail.*

- Rev.* (2011), 16(1):35-47. doi:10.1007/s10741-010-9170-x.
- [8] D. Glick, S. Barth, K.F. Macleod, Autophagy: Cellular and Molecular Mechanisms, *J Pathol.* (2010), 221(1):3-12. doi:10.1002/path.2697.
- [9] M. Nakaoka, E. Iwai-Kanai, M. Katamura et al., An Alpha-Adrenergic Agonist Protects Hearts by Inducing Akt1-mediated Autophagy, *Biochem Biophys Res Commun.* (2015), 456(1):250-256. doi:10.1016/j.bbrc.2014.11.067.
- [10] C. He, D.J. Klionsky, Regulation Mechanisms and Signalling Pathways of Autophagy, *Annu Rev Genet.* (2009) 43:67-93. doi:10.1146/annurev-genet-102808-114910.
- [11] M.R. Bristow, Adrenergic Receptor Blockade in Chronic Heart Failure, *Circulation* (2000), 101:558-569. doi:10.1161/01.CIR.101.5.558.
- [12] M.R. Bristow, G.A. Murphy, H. Krause-Steinrauf et al., An Alpha_{2C}-adrenergic Receptor Polymorphism Alters the Norepinephrine-lowering Effects and Therapeutic Response of the Beta-Blocker Bucindolol in Chronic Heart Failure, *Circ Hear Fail.* (2010), 3(1): 21-28. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.885962.
- [13] B.G. de Lima-Seolin, R. Colombo, J.H.P. Bonetto et al., Bucindolol Improves Right Ventricle Function in Rats with Pulmonary Arterial Hypertension Through the Reversal of Autonomic Imbalance, *Eur J Pharmacol.* (2016)., 798:57-65. doi:10.1016/j.ejphar.2016.12.028.
- [14] E.J. Eichhorn, J.B. Bedotto, C.R. Malloy et al., Effect of Beta-adrenergic Blockade on Myocardial Function and Energetics in Congestive Heart Failure. Improvements in Hemodynamic, Contractile, and Diastolic Performance with Bucindolol, *Circulation* (1990), 83(3):473-483. doi:10.1161/01.CIR.82.2.473.
- [15] S. Bryan, G. Yang, R. Wang et al., Cystathionine Gamma-lyase-deficient smooth muscle cells exhibit redox imbalance and apoptosis under hypoxic stress conditions, *Exp Clin Cardiol* (2011), 16(4):e36-41. PMID: 22131857.
- [16] E.A.I.F. Queiroz, S. Puukila, R. Eichler et al., Metformin Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest Mediated by Oxidative Stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 Breast Cancer Cells, *PLoS One* (2014), 9(5): e98207. doi:10.1371/journal.pone.0098207.
- [17] C. Schroeder, J. Jordan, Norepinephrine Transporter Function and Human

- Cardiovascular Disease, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2012), H1273-1282.
doi:10.1152/ajpheart.00492.2012.
- [18] X.L. Louis, S.J. Thandapilly, W. Kalt et al., Blueberry Polyphenols Prevent Cardiomyocyte Death by Preventing Calpain Activation and Oxidative Stress, *Food Funct* (2014), 5:1785-1794. doi:10.1039/c3fo60588d.
- [19] P. Fischer, D. Hilfiker-Kleiner, Survival Pathways in Hypertrophy and Heart Failure: The gp130-STAT3 Axis, *Basic Res Cardiol* (2007), 102(5):393-411.
doi:10.1007/s00395-007-0674-z.
- [20] W. Zhang, X. Qu, B. Chen et al., Critical Roles of STAT3 in β -adrenergic Functions in the Heart, *Circulation* (2016), 133(1):48-61.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017472.
- [21] R. Kishore, S.K. Verma, Roles of STATs Signaling in Cardiovascular Diseases, *JAKSTAT* (2012), 1(2):118-124. doi:10.4161/jkst.20115.
- [22] J. Turkson, STAT Proteins as Novel Targets for Cancer Drug Discovery, *Expert Opin Ther Targets* (2004) 8 (5):409-422. doi:10.1517/14728222.8.5.409.
- [23] Y.E.G. Eskildsen-Helmond, K. Bezstarosti, D.H.W. Dekkers et al., Cross-talk between Receptor-mediated Phospholipase C- β and D via Protein Kinase C as Intracellular Signal Possibly Leading to Hypertrophy in Serum-free Cultured Cardiomyocytes, *J Mol Cell Cardiol* (1997), 29(9):2545-2559.
doi:10.1006/jmcc.1997.0491.
- [24] J.R. McMullen, T. Shioi, L. Zhang et al., Deletion of Ribosomal S6 Kinases Does Not Attenuate Pathological, Physiological, or Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor-Phosphoinositide 3-Kinase-Induced Cardiac Hypertrophy, *Mol Cell Biol* (2004), 24(14):6231-6240. doi:10.1128/MCB.24.14.6231-6240.2004.
- [25] T. Aoyagi, T. Matsui, Phosphoinositide-3 Kinase Signaling in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure, *Curr Pharm Des* (2011), 17(18):1818-1824.
doi:10.2174/138161211796390976.
- [26] K. Pönicke, I. Heinroth-Hoffmann, O.E. Brodde, Differential Effects of Bucindolol and Carvedilol on Noradrenaline-induced Hypertrophic Response in Ventricular Cardiomyocytes of Adult Rats, *J Pharmacol Exp Ther* (2002), 301(1):71-76.
doi:10.1124/jpet.301.1.71.

- [27] C.H. Jung, S.H. Ro, J. Cao et al., MTOR Regulation of Autophagy, *FEBS Lett.* (2010), 584(7):1287-1295. doi:10.1016/j.febslet.2010.01.017.
- [28] L. You, Z. Wang, H. Li et al., The Role of STAT3 in Autophagy, *Autophagy* (2015), 11(5):729-739. doi:10.1080/15548627.2015.1017192.
- [29] M. Xu, Y.T. Zhao, Y. Song et al., Alpha1-adrenergic receptors activate AMP-activated protein kinase in rat hearts., *Sheng Li Xue Bao* (2007), 59(2):175-182. PMID: 17437040.
- [30] P. Aránguiz-Urroz, J. Canales, M. Copaja et al., Beta2-adrenergic Receptor Regulates Cardiac Fibroblast Autophagy and Collagen Degradation, *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* (2011), 1812(1):23-31. doi:10.1016/j.bbadis.2010.07.003.
- [31] P. Krishnamurthy, V. Subramanian, M. Singh et al., Beta1 Integrins Modulate Beta-adrenergic Receptor-stimulated Cardiac Myocyte Apoptosis and Myocardial Remodeling, *Hypertension*. (2007), 49(4):865-872. doi:10.1161/01.HYP.0000258703.36986.13.
- [32] W. Mughal, R. Dhingra, L.A. Kirshenbaum, Striking a Balance: Autophagy, Apoptosis, and Necrosis in a Normal and Failing Heart, *Curr Hypertens Rep.* (2012), 14(6):540-547. doi:10.1007/s11906-012-0304-5.
- [33] B.B. Wolf, D.R. Green, Suicidal Tendencies: Apoptotic Cell Death by Caspase Family Proteinases, *J Bio Chem.* (1999), 274(29):20049–20052. doi:10.1074/jbc.274.29.20049.
- [34] N. Saleem, S.K. Goswami, Activation of Adrenergic Receptor in H9c2 Cardiac Myoblasts Co-stimulates Nox2 and the Derived ROS Mediate the Downstream Responses, *Mol Cell Biochem.* (2017) 436(1-2):167-178. doi:10.1007/s11010-017-3088-8.
- [35] M.M. Gaschler, B.R. Stockwell, Lipid Peroxidation in Cell Death, *Biochem Biophys Res Commun.* (2017), 482(3):419-425. doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.086.
- [36] S. Choudhary, W. Zhang, F. Zhou et al., Cellular Lipid Peroxidation End-products Induce Apoptosis in Human Lens Epithelial Cells, *Free Radic Biol Med* (2002), 32(4):360-369. doi:10.1016/S0891-5849(01)00810-3.
- [37] J. Chen, L. Wang, Y. Chen et al., Phosphatidylinositol 3 Kinase Pathway and 4-Hydroxy-2-nonenal-induced Oxidative Injury in the RPE, *Invest. Ophthalmol. Vis.*

Sci. (2009) 50:936-942. doi:10.1167/iovs.08-2439.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Immunocontent of proteins involved in signaling pathways for survival and cell death. H9c2 cardiac cells were incubated with norepinephrine (10 μ M) during a period of 24h, followed by 8h of bucindolol (10 μ M) treatment. β -actin was used for normalization. Immunocontent of p-STAT3 / total-STAT3 (**A**), PI3K (**B**), p-Akt / total-Akt (**C**), p-mTOR / mTOR (**D**), P70 S6K (**E**), p-AMPK / total AMPK (**F**), and LC3-II / LC3-I (**G**) was determined. Values were expressed as mean \pm SD from 4 independent experiments. Two-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls: ^a*P* < 0.05 vs. Control Untreated (CTL), ^b*P* < 0.05 vs. Norepinephrine Untreated (NE), ^c*P* < 0.05 vs. Control+Bucindolol (CTL+BCD), ⁺*P* < 0.05 CTL and CTL+BCD vs. NE and Norepinephrine+Bucindolol (NE+BCD), ^{*}*P* < 0.05 CTL+BCD and NE+BCD vs. CTL and NE.

Figure 2. Active caspase 3/7 was determined in H9c2 cardiac cells incubated with norepinephrine (10 μ M) during a period of 24h, followed by 8h of bucindolol (10 μ M) treatment. Representative histogram showing FL1-H fluorescence versus cells counts, indicating activated caspase-3/7 (M2 area). Values expressed as mean \pm SD from 3 independent experiments. Two-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls: ^a*P* < 0.05 vs. Control Untreated (CTL), ^b*P* < 0.05 vs. Norepinephrine Untreated (NE), ⁺*P* < 0.05 CTL and Control+Bucindolol (CTL+BCD) vs. NE and Norepinephrine+Bucindolol (NE+BCD), ^{*}*P* < 0.05 CTL+BCD and NE+BCD vs. CTL and NE.

Figure 3. Cell death analysis by propidium iodide (PI) staining in H9c2 cardiac cells treated with norepinephrine (10 μ M) for 24h, followed by 8h of bucindolol (10 μ M). PI shows the

percent of necrosis in a cell population (A). Representative histogram indicating FL-2 fluorescence versus cells counts is shown. Values expressed as mean \pm SD from 3-4 independent experiments (B). Two-way ANOVA: ^b $P < 0.05$ vs. Norepinephrine Untreated (NE), * $P < 0.05$ Control+Bucindolol (CTL+BCD) and Norepinephrine+Bucindolol (NE+BCD) vs. CTL and NE.

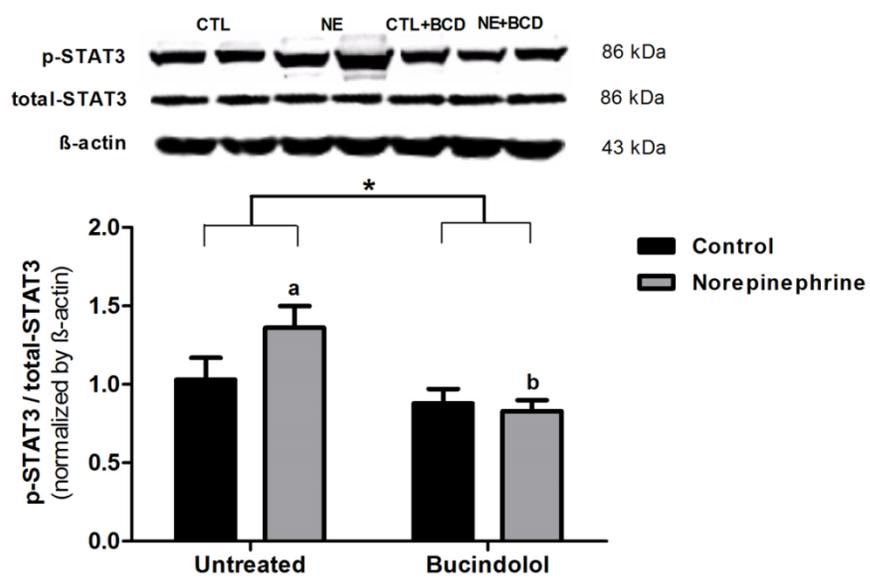
Figure 4. Oxidative stress analysis in H9c2 cardiac cells incubated with norepinephrine (10 μ M) for 24 hours, followed by 8 hours of bucindolol (10 μ M) treatment. ROS was determined by the CM-H₂DCFDA assay, and measured by flow cytometry (A). Representative histogram indicating cell counts of ROS levels versus FL1-H fluorescence (B). Values expressed as mean \pm SD from 3 independent experiments. Two-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls: ^b $P < 0.05$ vs. Norepinephrine Untreated (NE), * $P < 0.05$ Control+Bucindolol (CTL+BCD) and Norepinephrine+Bucindolol (NE+BCD) vs. Control Untreated (CTL) and NE.

Figure 5. Lipid peroxidation measured by determination of relative protein levels of 4-hydroxynonenal (4-HNE) adducts in H9C2 cardiac cells incubated with norepinephrine (10 μ M) for 24h, followed by 8h of bucindolol (10 μ M) treatment. β -actin was used for normalization. Values expressed as mean \pm SD from 3 - 4 independent experiments. Two-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls: ^a $P < 0.05$ vs. Control Untreated (CTL), ^b $P < 0.05$ vs. Norepinephrine Untreated (NE), ⁺ $P < 0.05$ CTL and Control+Bucindolol (CTL+BCD) vs. NE and Norepinephrine+Bucindolol (NE+BCD).

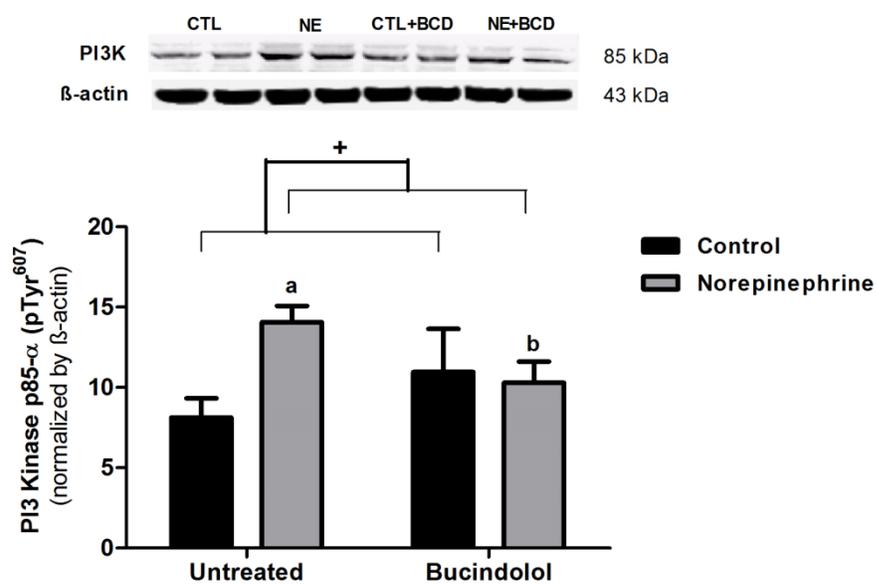
FIGURES

FIGURE 1

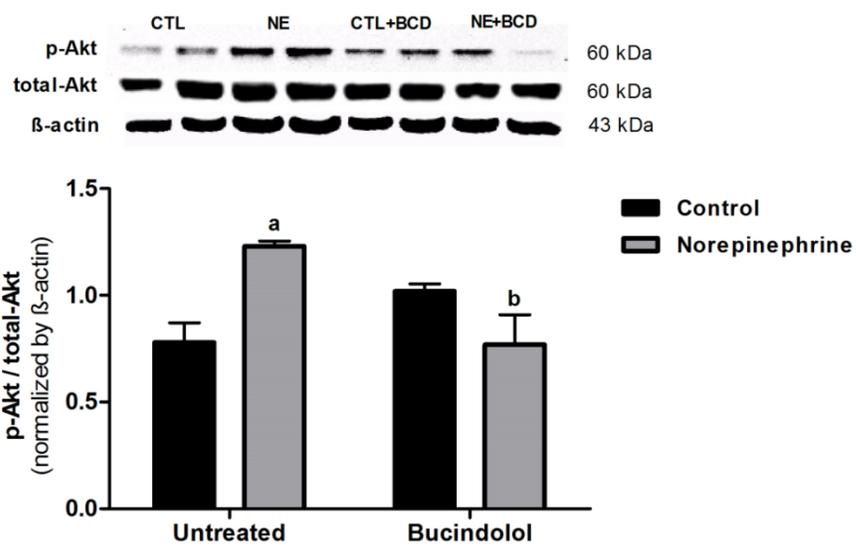
A



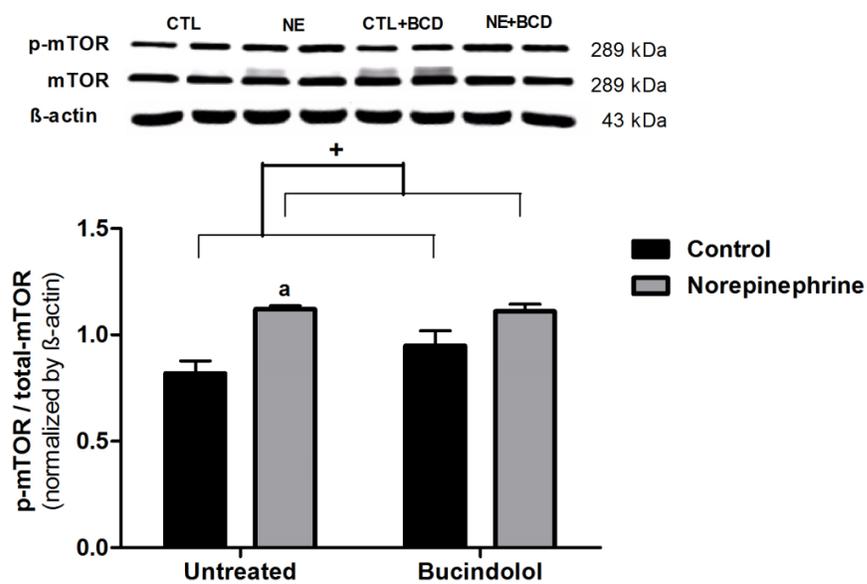
B



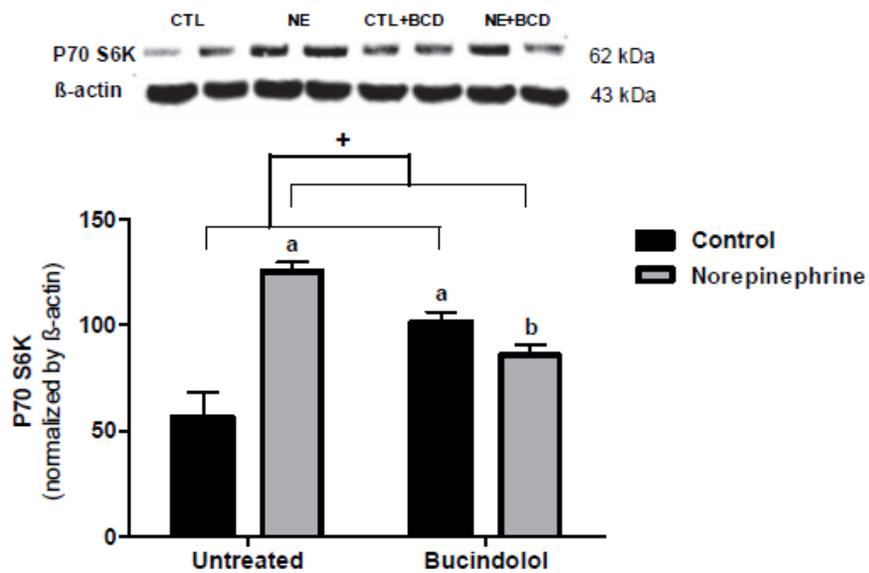
C



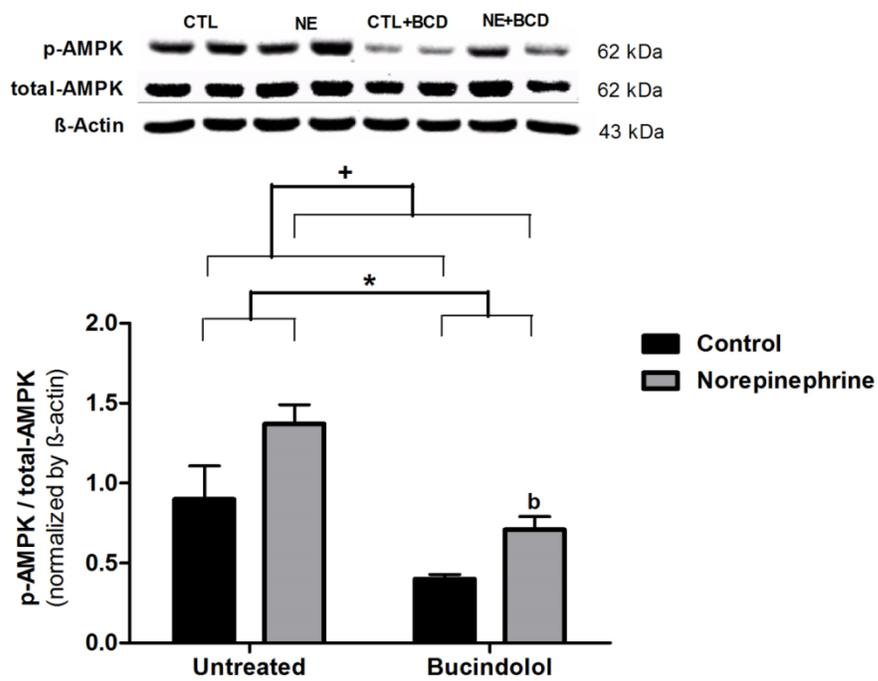
D



E



F



G

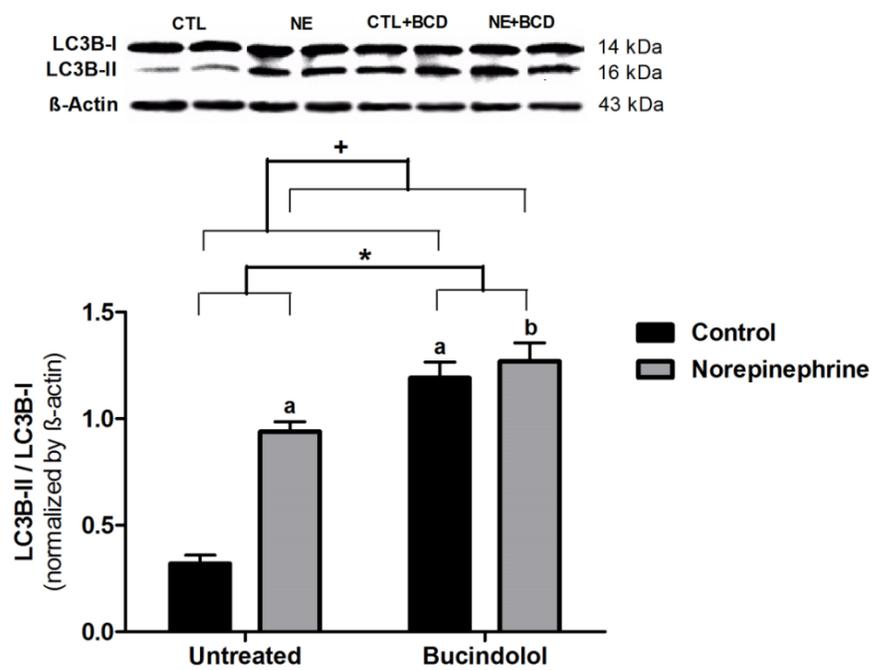
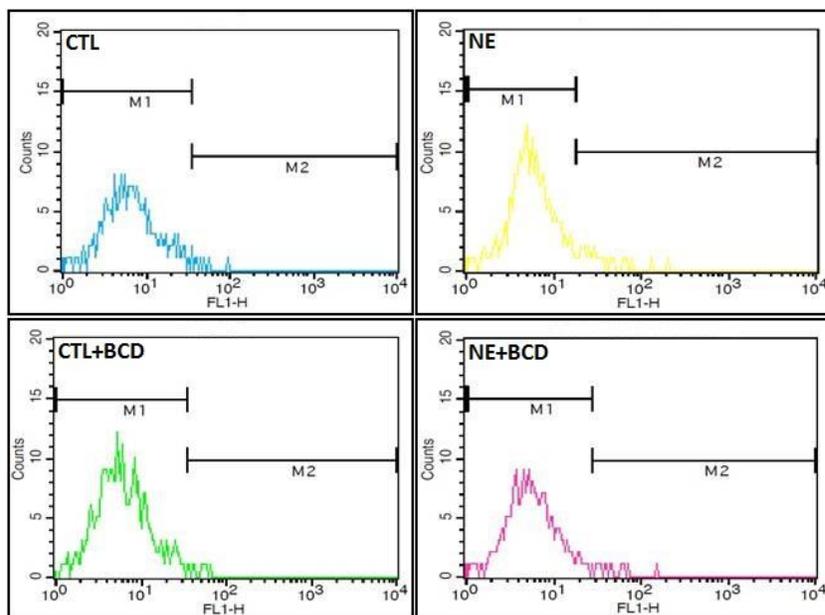


FIGURE 2

A



B

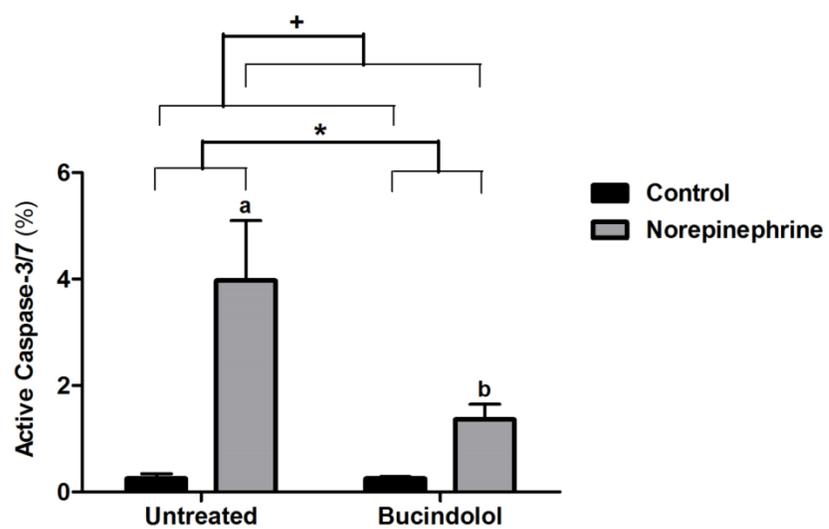
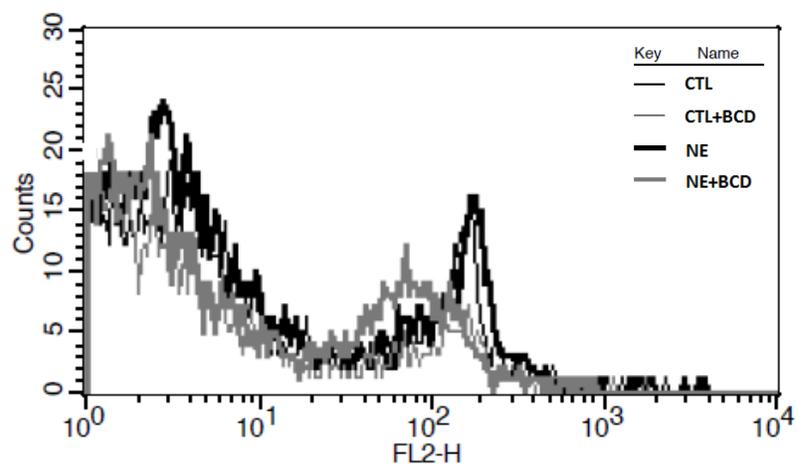


FIGURE 3

A



B

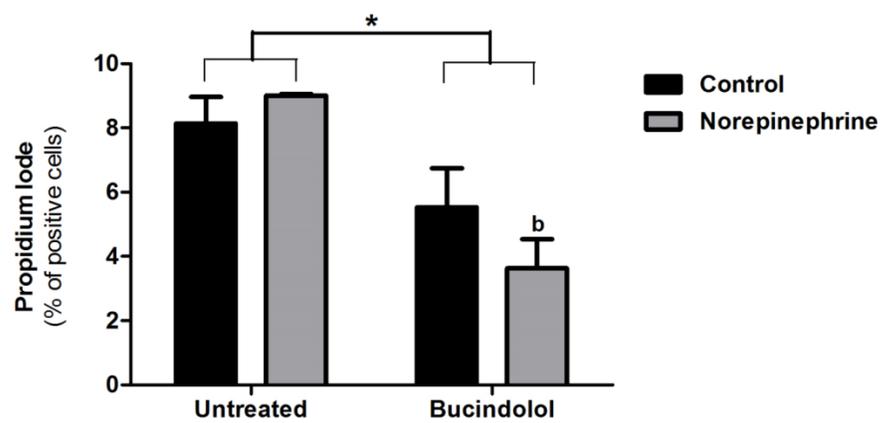
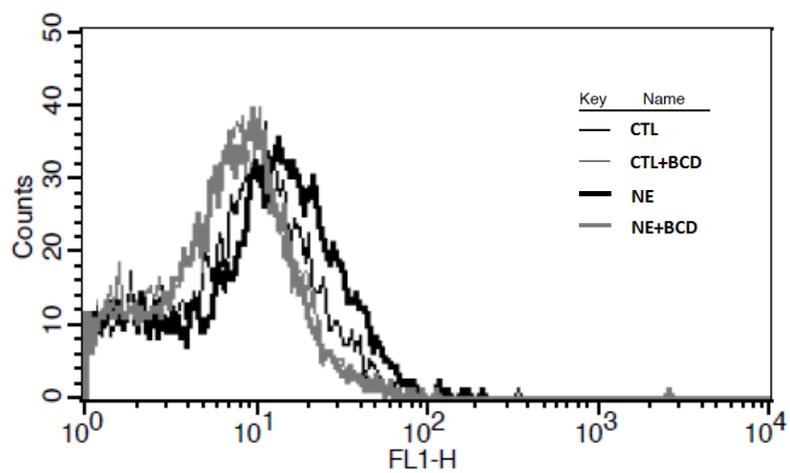


FIGURE 4

A



B

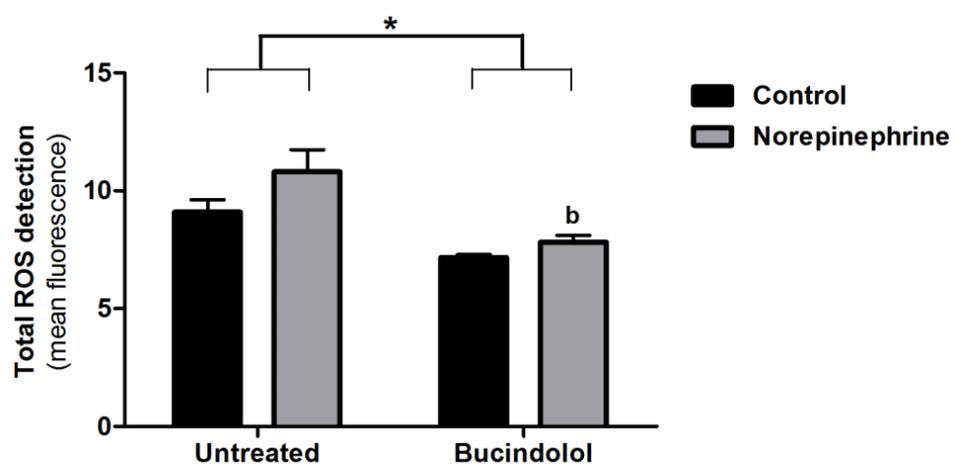


FIGURE 5

