

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Alexandre Roberto Hickmann

**EFEITO DO PTEROSTILBENO COMPLEXADO COM CICLODEXTRINA SOBRE
A RESISTÊNCIA VASCULAR E PARÂMETROS OXIDATIVOS EM PULMÃO DE
RATOS COM HIPERTENSÃO PULMONAR**

Porto Alegre

2018

Alexandre Roberto Hickmann

**EFEITO DO PTEROSTILBENO COMPLEXADO COM CICLODEXTRINA SOBRE
A RESISTÊNCIA VASCULAR E PARÂMETROS OXIDATIVOS EM PULMÃO DE
RATOS COM HIPERTENSÃO PULMONAR**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo

Coorientadora: Ma. Denise dos Santos Lacerda

Porto Alegre

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Hickmann, Alexandre Roberto

Efeito do pterostilbeno complexado com ciclodextrina sobre a resistência vascular e parâmetros oxidativos em pulmão de ratos com Hipertensão pulmonar / Alexandre Roberto Hickmann. -- 2018.

73 f.

Orientador: Alex Sander da Rosa Araujo.

Coorientadora: Denise dos Santos Lacerda.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Hipertensão arterial pulmonar. 2. Pterostilbeno. 3. Monocrotalina. 4. Pulmão. 5. Estresse oxidativo. I. Araujo, Alex Sander da Rosa, orient. II. Lacerda, Denise dos Santos, coorient.

Alexandre Roberto Hickmann

**EFEITO DO PTEROSTILBENO COMPLEXADO COM CICLODEXTRINA SOBRE
A RESISTÊNCIA VASCULAR E PARÂMETROS OXIDATIVOS EM PULMÃO DE
RATOS COM HIPERTENSÃO PULMONAR**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Cristina Campos-Carraro - UFRGS

Dra. Elvira Alicia Aparicio Cordero - UFRGS

Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo - UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o centro e o fundamento de tudo em minha vida, por renovar a cada momento a minha força e disposição e pelo discernimento concedido ao longo dessa jornada.

Agradeço a minha família, em especial minha mãe, por ter acreditado em mim e por ser um grande exemplo de família, força e coragem.

Às amigas Juliana e Débora, por estarem sempre presentes nos melhores e piores momentos. Reforço que mesmo durante nossas brigas e discussões sempre amei muito vocês. Sou muito grato pela felicidade e diversão que vocês duas me proporcionam!

Aos amigos Samuel, Lucas, Giuseppe, Bruna Oliveira, Franciele, Martina, Letícia, Mônia e Eloísa, pela companhia e parceria na convivência desses anos dentro e fora da universidade. Além é claro de terem aguentado minhas reclamações quase que diárias e meus áudios extensos no celular. Agradeço ao Raul pela amizade e por seu olhar crítico acerca de tudo, principalmente sobre filmes e séries, o que me fez crescer muito nessa área. À Giovana e Maia, sou grato pelo companheirismo nos trabalhos da faculdade e pelas conversas e risadas que dividimos nesse meio tempo, o que me fez encarar tudo com muita felicidade e um belo sorriso no rosto.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFRGS, pelo acolhimento, pelo convívio, pelos ensinamentos e pelas risadas. Hoje posso dizer que sou o resultado da confiança e força de cada um de vocês.

À minha coorientadora Denise, pelo incentivo, apoio e parceria de todo momento. Sua força de vontade e competência seguirão sempre comigo como um grande aprendizado!

Ao Professor Alex, que me acolheu de braços abertos no laboratório, acreditando nas minhas potencialidades, me incentivando a construir e desenvolver meu conhecimento sempre com respostas claras e breves às dúvidas que pairavam sobre mim. Muito obrigado!

"Ninguém que é curioso é idiota. As pessoas que não fazem perguntas permanecem ignorantes para o resto de suas vidas."

(Neil deGrasse Tyson)

RESUMO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP), patologia grave e progressiva, tem instalação aguda ou insidiosa, inicialmente com sintomas inespecíficos e mau prognóstico. A HAP leva ao remodelamento vascular com subsequente aumento da resistência vascular pulmonar (RVP) e pressão média da artéria pulmonar (mPAP). Além dos efeitos deletérios no pulmão, o ventrículo direito (VD) sofre hipertrofia e posteriormente insuficiência cardíaca (IC), resposta ao aumento da pós-carga. Atualmente sabe-se que o uso de fitoquímicos naturais ajudam a atenuar a progressão da IC. Em virtude disso, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do fitofenol pterostilbeno complexado a ciclodextrina (PTS:HP β CD) sobre parâmetros ecográficos e oxidativos em tecido pulmonar no modelo experimental de HAP induzida pela monocrotalina (MCT). Para isso, ratos Wistar machos foram divididos em 3 grupos: controle (CTR), monocrotalina (HAP), e monocrotalina + PTS:HP β CD (HAP+PTS). Neste estudo a HAP foi induzida mediante dose única de monocrotalina (60 mg/kg, i.p.). Ao final do tratamento, foram avaliados dados ecográficos de RVP, mPAP e fluxo sanguíneo através da razão do tempo de aceleração e tempo de ejeção na artéria pulmonar (TAC/TEJ). Após a eutanásia dos animais, foram coletados os pulmões para analisar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), atividade de enzimas antioxidantes e lipoperoxidação. Observamos que o fitoquímico pterostilbeno não apresentou efeitos sobre a RVP assim como a mPAP, contudo foi capaz de melhorar parcialmente o fluxo sanguíneo na artéria pulmonar, possivelmente através da modulação de enzimas antioxidantes que reduziram parcialmente os níveis de peróxido de hidrogênio. O tratamento com PTS:HP β CD diminuiu os níveis de EROs e peróxido de hidrogênio, evidenciando o papel antioxidante da GPx, além de diminuir a atividade da SOD. Os dados obtidos sugerem que esse tratamento parece estar causando diferentes alterações em tecido pulmonar que podem apresentar impacto direto nas mudanças que já foram evidenciadas no VD.

Palavras-chave: Hipertensão arterial pulmonar. Pterostilbeno. Monocrotalina. Pulmão. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension (PAH), a serious and progressive pathology, has an acute or insidious onset, initially with nonspecific symptoms and poor prognosis. PAH leads to vascular remodeling with subsequent increase in pulmonary vascular resistance (PVR) and mean pulmonary artery pressure (mPAP). Beyond to the deleterious effects on the lungs, the right ventricle (RV) undergoes hypertrophy and subsequently heart failure (HF), a response to increased post-load. Current known that the use of natural phytochemicals helps to mitigate the progression of HF. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of phytophenol complexed pterostilbene to cyclodextrin (PTS: HP β CD) over ultrasound and oxidative parameters in lung tissue in the experimental monocrotalin-induced PAH model. For this, male Wistar rats were divided into 3 groups: control (CTR), monocrotaline (HAP), and monocrotaline + PTS: HP β CD (HAP + PTS). In this study, PAH was induced by a single dose of monocrotaline (60 mg / kg, i.p.). At the end of the treatment, pulmonary vascular resistance (PVR), mean pulmonary artery pressure (mPAP) and blood flow through the rate of acceleration time and ejection time in the pulmonary artery (AT / ET) were evaluated. After euthanasia, lungs were collected from the animals to analyze the production of reactive oxygen species (ROS), antioxidant enzyme activity and lipoperoxidation were also analyzed. We observed that the phytochemical pterostilbene had no effect on pulmonary vascular resistance neither on mean pulmonary artery pressure, but was able to partially improve blood flow in the pulmonary artery, possibly through the modulation of antioxidant enzymes that partially reduced the levels of peroxide hydrogen. Treatment with PTS: HP β CD decreased ROS and hydrogen peroxide levels, evidencing the antioxidant role of GPx as well as decreasing SOD activity. Obtained suggest that this treatment appears to be causing different changes in lung tissue that may have a direct impact on modifications that have already been evidenced in the right ventricle (RV).

Keywords: Pulmonary arterial hypertension. Pterostilbene. Monocrotaline. Lung. Oxidative stress.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	HIPERTENSÃO PULMONAR	9
1.2	HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR.....	9
1.2.1	Definição	9
1.2.2	Epidemiologia	10
1.2.3	Tratamento farmacológico da HAP	11
1.2.4	Fisiopatologia	11
1.3	ESTRESSE OXIDATIVO.....	13
1.4	COMPOSTOS FENÓLICOS	16
1.5	PTEROSTILBENO	17
1.6	PTEROSTILBENO E CICLODEXTRINA	18
1.7	MODELO EXPERIMENTAL	20
2	JUSTIFICATIVA	22
3	OBJETIVOS	23
3.1	OBJETIVO GERAL.....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4	ARTIGO CIENTÍFICO	24
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	49
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA <i>BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY</i>	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 HIPERTENSÃO PULMONAR

A hipertensão pulmonar (HP) é uma doença crônica, de rápida evolução e mau prognóstico (HOEPER; GRANTON, 2011), caracterizada por uma pressão média da artéria pulmonar (mPAP) ≥ 25 mmHg, durante cateterismo cardíaco em repouso (HOEPER et al., 2013). Trata-se de uma comorbidade comum a muitas doenças cardíacas e pulmonares, para as quais a condição do leito vascular pulmonar frequentemente é a principal determinante das manifestações clínicas, do prognóstico e da exequibilidade do tratamento (GOLDAMAN, 2014).

A classificação mais atual da HP, apresentada em 2013, no V Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar, a divide em cinco grupos que compartilham semelhanças nos mecanismos fisiológicos e abordagens terapêuticas, onde o grupo da hipertensão arterial pulmonar mostra ter um certo destaque (SIMONNEAU et al., 2013).

1.2 HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

1.2.1 Definição

A hipertensão arterial pulmonar (HAP), apresenta-se como uma doença de remodelamento vascular que gera aumento da resistência vascular pulmonar (RVP) (MALENFANT et al., 2013). Ainda que sua etiologia permaneça obscura, supõe-se que a interação entre a pré-disposição genética e fatores de riscos ambientais possam estar envolvidos (CHIN; RUBIN, 2008). A HAP pode ser sub-classificada em: HAP idiopática, HAP hereditária, HAP induzida por drogas e toxinas e HAP associada a doenças. A apresentação clínica desta doença se dá principalmente por dispneia, fadiga, fraqueza, intolerância ao esforço, angina, e edema de extremidades (CHIN; RUBIN, 2008; CROSSWHITE; SUN, 2010). Entretanto, devido aos sintomas iniciais serem inespecíficos, o diagnóstico da HAP comumente é realizado já em fases avançadas, e o diagnóstico geralmente é estabelecido quando já existe comprometimento do ventrículo direito (VD). Além disso, a doença leva à perda da capacidade do leito vascular pulmonar de se dilatar e recrutar uma vasculatura não utilizada para acomodar os aumentos no fluxo sanguíneo, ao aumento da mPAP (CHOPRA et al., 2012). Além dos efeitos deletérios no pulmão, esta doença leva à hipertrofia do VD em resposta à elevação da

pós-carga. Esse quadro, que resulta na progressiva disfunção ventricular direita, recebe o nome de *Cor pulmonale* (SHUJAAT; MINKIN; EDEN, 2007).

A ecografia transtorácica, como por exemplo o eletrocardiograma, é uma ferramenta que vem sendo utilizada para rastreamento de pacientes em risco de HAP, mesmo não sendo utilizada para confirmação definitiva da presença ou ausência da HAP. É, usualmente, o primeiro exame que indica possibilidade do paciente estar com HAP, e o seu uso, associado a técnicas de Doppler, podem auxiliar nessa suspeita (HABIB; TORBICKI, 2010). Além disso, o eletrocardiograma também pode ser útil na suspeita de HAP ao indicar desvio de eixo ou hipertrofia de VD. Portanto, com base nessa avaliação ecográfica, os pacientes que apresentarem sinais sugestivos de HAP devem ser encaminhados para o exame invasivo de cateterismo cardíaco direito, que irá fornecer o diagnóstico preciso e a determinação da severidade da doença (CHIN; RUBIN, 2008).

1.2.2 Epidemiologia

Estima-se que a incidência mundial da HAP ocorra em torno de 10 a 52 casos por milhão de habitantes (KIELY et al., 2013; PEACOCK et al., 2007), com maior incidência na sexta década de vida. Nesses pacientes, se observa um maior número de mulheres acometidas pela doença em comparação com homens, sendo a razão dessa preponderância ainda desconhecida (HUMBERT et al., 2006; MCGOON et al., 2013). A exata prevalência da doença também é desconhecida, podendo ser largamente subestimada. Nos Estados Unidos, cerca de 200 mil hospitalizações anualmente tem a HAP como causa primária ou secundária. Se estima uma prevalência na Europa de 0,3 – 6% (MOCUMBI; THIENEMANN; SLIWA, 2018). No Brasil, a HAP associada à esquistossomose é uma das formas mais prevalentes da doença, juntamente com a idiopática (LAPA et al., 2009). Este estudo também demonstrou que 8% dos pacientes com esquistossomose apresentaram HAP, caracterizando a infecção por *S. mansoni* um importante fator de desenvolvimento da doença, possivelmente devido ao estímulo inflamatório causado pelo parasita.

Em outras análises, pacientes do sexo masculino são os que sofrem mais mortalidade pela doença, além disso, fatores como a alteração hemodinâmica cardíaca direita, a RVP alta e a limitação de exercício foram descritos como fatores intimamente ligados ao aumento da mortalidade em pacientes com HAP (BENZA et al., 2010; HUMBERT et al., 2010). Apesar disso, o estado funcional do coração é um importante fator prognóstico da doença, sendo mais relevante que os níveis de mPAP (TUDER et al., 2009).

Em geral, a sobrevivência média dos pacientes é de aproximadamente 10 anos com o tratamento, em comparação a uma sobrevivência de 2,8 anos quando não tratados (MCGOON et al., 2013; OGAWA; EJIRI; MATSUBARA, 2014). Mudanças na epidemiologia da HAP podem ter sido influenciadas por fatores independentes da patologia em si, como modificações na sua classificação, maior precisão no diagnóstico e maior acesso aos tratamentos.

1.2.3 Tratamento farmacológico da HAP

Atualmente na clínica, para o tratamento da HAP, são utilizados fármacos como, por exemplo, o Bosentan (antagonista competitivo da ET-1 e inibe a sua ligação com os seus receptores) e o Sildenafil (um inibidor da enzima fosfodiesterase 5) (CHEN et al., 1995; CORBIN et al., 2005; LAI et al., 2014; MONTANI et al., 2014) que atuam na tentativa de minimizar os sintomas promovidos pela disfunção endotelial encontrados nesses pacientes. Porém, além do alto custo, a utilização desses fármacos provoca inúmeros efeitos colaterais. Dessa forma, estudos que busquem tratamentos que promovam manutenção da função do VD, da função endotelial, bem como que estimulem a produção de enzimas antioxidantes e a diminuição do estresse oxidativo seriam importantes ferramentas benéficas como tratamento adjuvante para pacientes com HAP. Dentre essas estratégias, podem ser citadas a prática regular de exercício físico e a utilização de antioxidantes exógenos (como Vitamina E).

1.2.4 Fisiopatologia

A HAP é descrita como uma irregularidade circulatória devido aos mecanismos que envolvem vasoconstrição e remodelamento de pequenas artérias e arteríolas pulmonares, com subsequente aumento do tônus vascular e RVP (MCLAUGHLIN et al., 2015). Esse desbalanço promove aumento da espessura da túnica média, remodelamento da túnica adventícia e formação da neoíntima. O envolvimento de células inflamatórias, macrófagos e linfócitos, também já foi descrito como característico da HAP, principalmente na forma idiopática (COOL et al., 1999; HUMBERT et al., 2004). O infiltrado inflamatório é encontrado na região perivascular e junto ao tecido conjuntivo dos vasos (TUDER et al., 1999).

Em decorrência da vasoconstrição e do aumento da RVP, todas as diferentes categorias da HAP (ver Tabela 1) são caracterizadas por vasoconstrição pulmonar excessiva, acompanhada de um processo de remodelamento vascular anormal, que usualmente afeta todas as camadas do vaso e resulta em severa perda de área de secção transversal (SIMONNEAU et al., 2013). Mudanças na túnica íntima incluem dano endotelial, proliferação de células endoteliais, invasão da íntima por células tipo miofibroblastos, aumento da deposição de matriz

extracelular levando à fibrose e, muitas vezes, obstrução do lúmen vascular em decorrência das lesões plexiformes (SCHERMULY et al., 2011). Como consequência, há um aumento da RVP, que resulta em sobrecarga de pressão ao VD. Além disso, a artéria pulmonar apresenta complacência diminuída, o que também contribui para o aumento de trabalho e a distensão do VD (LAI et al., 2014) (Figura 1).

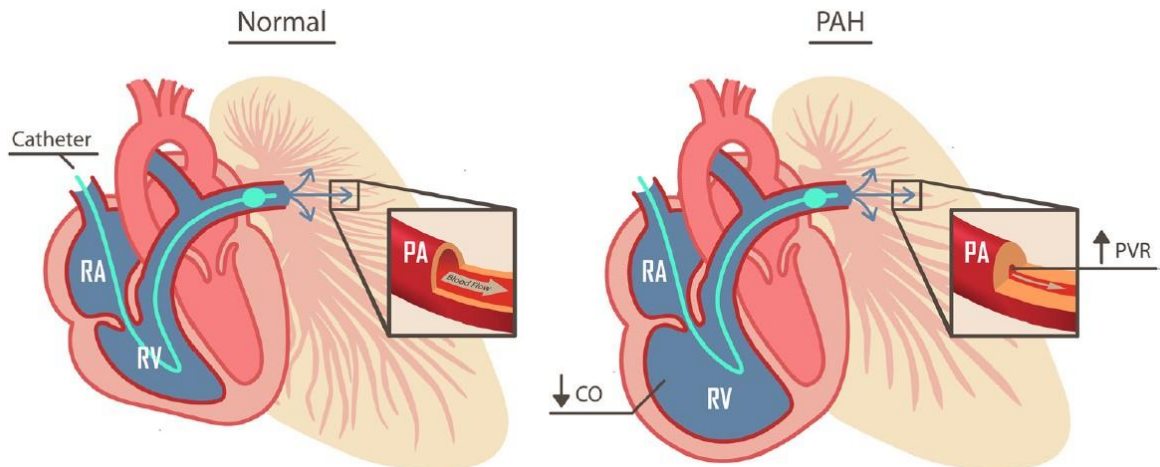


Figura 1. Comparação da estrutura do VD e artéria pulmonar em situação normal, à esquerda, e na HAP, à direita. RA = átrio direito; RV = ventrículo direito; PA = artéria pulmonar; PVR = resistência vascular pulmonar; CO = débito cardíaco.

Fonte: adaptado de Lai et al., 2013.

Para que ocorra a redução do estresse de parede e manutenção da função sistólica, segundo a Lei de Laplace (equação abaixo), por via compensatória, o VD sofre hipertrofia (BOGAARD et al., 2009).

$$\text{Lei de Laplace: } \sigma = \frac{P \times r}{h}$$

Onde:

σ = estresse da parede

P = pressão intraluminal

r = raio interno da câmara do coração

h = espessura da parede da câmara do coração

Uma outra característica bem proeminente no contexto da HAP é o desequilíbrio do estado redox, visto que as espécies reativas de oxigênio (EROs) podem causar prejuízo na função contrátil do coração e podem influenciar os processos de sinalização intracelular, podendo desencadear hipertrofia cardíaca, apoptose e necrose (MACCARTHY; SHAH, 2003).

Estudos demonstraram que, em um estágio compensado da hipertrofia cardíaca, as defesas antioxidantes no tecido aumentam, enquanto que, em um padrão reduzido/insuficiente do músculo cardíaco, essa reserva se encontra reduzida, comprometendo assim, o balanço redox, e, conseqüentemente, favorecendo o estresse oxidativo (SINGAL et al., 1999).

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO

Radicais livres (RL) são produtos do metabolismo normal, derivados tanto de fontes endógenas (mitocôndrias, peroxissomos,) quanto exógenas (poluição, fumaça, metais pesados, radiação) (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015). Os RL são átomos ou moléculas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada de valência, tornando-o instável e reativo, (KYAW et al., 2004; PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015).

Os mecanismos químicos implícitos à formação dos radicais livres e sua toxicidade foram propostos em 1894 pelo químico Henry JH Fenton, que mostrou que a formação do OH, a partir do H_2O_2 , é catalisada por íons ferro e chamada de Reação de Fenton (KOPPENOL, 1993). Posteriormente, em 1934, os químicos Joseph Weiss e Fritz Haber, descobriram que o O_2^- pode se combinar com H_2O_2 e, formar OH, a chamada reação de Haber-Weiss (KEHRER, 2000). Esta reação mostra que um radical livre pode dar origem a um outro radical secundário.

Em especial, a molécula de O_2 é considerada um radical livre, pois a mesma possui dois elétrons desemparelhados, entretanto, seus elétrons possuem spins paralelos, o que restringe sua reatividade. Dessa forma, apesar de não ter alta reatividade, o oxigênio pode ser considerado um agente oxidante (HALLIWELL, 2006), pois a partir dele são geradas as espécies reativas de oxigênio.

O termo espécies reativas engloba tanto moléculas reativas quanto radicais livres (DINH et al., 2014; KYAW et al., 2004). As espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) também são geradas por fontes endógenas ou exógenas (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015) e também podem desempenhar papel patológico. Em concentrações baixas, EROs e ERNs estão envolvidas fisiologicamente na defesa do organismo, mas, em altas concentrações, as espécies reativas geram estresse oxidativo e nitrosativo, causando danos a biomoléculas, como lipídeos, proteínas e DNA (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015; SITI; KAMISAH; KAMISIAH, 2015).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e de defesas antioxidantes, em favor dos primeiros, ou em decorrência da diminuição

dos segundos (MACCARTHY; SHAH, 2003). Análises recentes apontam que o estresse oxidativo é um potente mediador da HP e das mudanças patológicas associadas à vasculatura pulmonar e ao VD (DEMARCO et al., 2010).

As EROs possuem uma variedade de espécies, tais como: oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$), radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) (AFANAS'EV, 2011; POLJSK, 2011). Essas moléculas possuem características específicas, com reatividades e tempos de meia-vida diferentes (YU, 1994). As espécies reativas de oxigênio podem ser produzidas em quase todos os tipos celulares, incluindo as células endoteliais, as células de músculo liso, os cardiomiócitos e as células da musculatura esquelética (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015).

A reatividade e instabilidade são pontos marcantes das EROs (com exceção do H_2O_2), já que interagem com outras moléculas biológicas e, conseqüentemente, exercem efeitos prejudiciais, quando em altas concentrações, a proteínas, carboidratos e lipídios da membrana e ao DNA (HALLIWELL B., 2015; TABIMA; FRIZZELL; GLADWIN, 2012; TRACHOOTHAM et al., 2008). Essas espécies são continuamente produzidas no organismo durante o metabolismo celular e desempenham funções fisiológicas importantes quando em concentrações baixas ou moderadas (LUSHCHAK, 2014). Logo depois da descoberta de que as ações das espécies reativas de oxigênio variavam de acordo com a sua concentração, houve redefinição para o termo estado redox. Percebeu-se que, em concentrações normais, as espécies reativas estão relacionadas com a sinalização celular, defesa do organismo contra xenobióticos e desencadeamento de eventos redox-sensíveis (proliferação, adesão e sobrevivência celular) (SAMJOO et al., 2013; TSUTSUI; KINUGAWA; MATSUSHIMA, 2009).

Na tentativa de reduzir ou até mesmo inibir os efeitos deletérios dessas espécies, o organismo possui um sistema de defesa antioxidante complexo e bastante eficiente (SIES, 1997). Um antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada a do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente sua oxidação (HALLIWELL, 2006). Os antioxidantes reduzem a produção de espécies reativas no meio intracelular, impedimento a propagação do dano promovido. Adicionalmente, os antioxidantes são capazes de quelar metais de transição que catalisam a formação de espécies reativas (YU, 1994). Os antioxidantes enzimáticos mais conhecidos são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (MCCORD; FRIDOVICH, 1969) e, os principais antioxidantes não-enzimáticos são glutathione reduzida (GSH), os tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), β -caroteno e bilirrubina (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000; WULF, 2002). Assim, as enzimas antioxidantes desempenham um

papel fundamental na regulação dos níveis de oxidantes nas células, e a sua desregulação tem sido implicada na fisiopatologia da HAP. Geralmente, ocorre uma integração de vários destes componentes antioxidantes (BIRBEN et al., 2012)

A SOD atua dismutando o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 . O peróxido de hidrogênio, na presença de metais de transição, tais como os íons ferro (Fe^{+2}), pode sofrer uma reação não enzimática, reação de Fenton, que gera uma das mais potentes espécies reativas de oxigênio, o radical $\bullet OH$, provavelmente a EROs que induz mais alterações nos sistemas biológicos (FRIDOVICH, 1995; MILLER, 2012). Esse radical, além de ser o principal iniciador do processo de peroxidação lipídica, é capaz de alterar a estrutura e a função biológica de proteínas e causar mutações no DNA (NG et al., 2007)

As peroxidases, como CAT e GPx, são responsáveis pela metabolização do H_2O_2 . Esse processo é importante, pois previne a formação do radical hidroxil, através das reações de Fenton ou de Haber-Weiss (KEHRER, 2000; KOPPENOL, 1993). A CAT, presente nos peroxissomos, promove a catálise do H_2O_2 em H_2O e O_2 , enquanto a GPx, presente no citosol e nas mitocôndrias, catalisa a reação $H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow GSSG + 2 H_2O$, ou seja, reduz o H_2O_2 numa reação que envolve, também, a oxidação da GSH (Figura 2) (TRACHOOTHAM et al., 2008). Assim, CAT e GPx impedem o acúmulo de peróxido de hidrogênio, impedindo a formação do radical hidroxil, contra o qual não há sistemas enzimáticos de defesa específicos (YU, 1994).

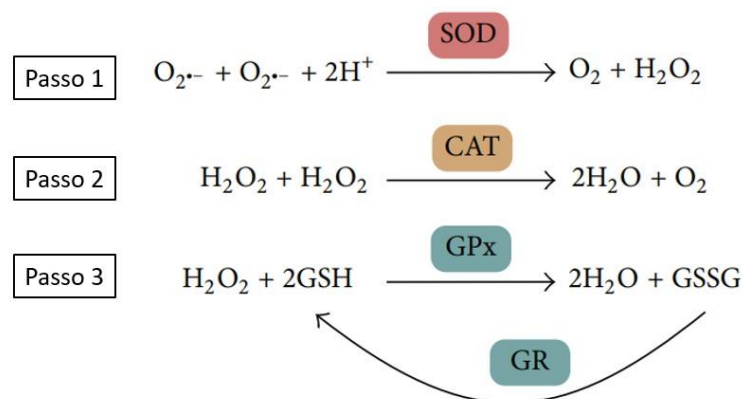


Figura 2. Sistema de defesa antioxidante enzimático e suas reações de eliminação de radicais livres e óxido de hidrogênio. SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; GPx, glutaciona peroxidase; e GR, glutaciona redutase.

Fonte: adaptado de Peng et al., 2014.

O estresse oxidativo está relacionado a diversas doenças, como a HAP (BRITO et al., 2015; DELBIN; ANTUNES; ZANESCO, 2009). Estudos têm avaliado a atividade e a expressão das enzimas SOD, CAT e GPx na busca de respostas para as causas e consequências

da doença. Portanto, novos ensaios e intervenções são necessárias, que possam modular as defesas antioxidantes, bem como a busca de novas terapias que possam atuar sobre esse cenário e melhorar o prognóstico e a sobrevida de pacientes com HAP.

1.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

Compostos fenólicos são metabólitos secundários das plantas. Até agora, mais de 8.000 tipos fenólicos foram encontrados em fontes naturais que são classificados em ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos, cumarinas, ligninas e taninos. Fenóis desempenham um papel crucial nas plantas, controlando seu crescimento como um regulador fisiológico interno (CHEYNIER et al., 2013). E na parte externa as protegem dos comprimentos de onda fatais de alta energia, absorvendo-as antecipadamente, ou seja parte rica em elétrons (YAMADA et al., 2006).

A diferenciação de compostos fenólicos está nos grupos funcionais hidroxila (OH) e metoxil (OCH₃), que decidem as diferenças individuais de cada ácido fenólico. Os ácidos fenólicos ingeridos são absorvidos no trato gastrointestinal e circulam na corrente circulatória após metilação, sulfatação e glucuronidação no fígado (MANACH et al., 2018). Estes processos auxiliam na hidrofiliabilidade dos compostos fenólicos e também na hora de removê-los através da via biliar ou urinária. (ARDINI et al., 2002).

Possuem múltiplos efeitos biológicos, incluindo atividade antioxidante (KA, 1999). Na dieta humana, os polifenóis são a contribuição mais importante para a atividade antioxidante (KIM; WEON; LEE, 2003). Como antioxidantes, os compostos fenólicos são capazes de diminuir a concentração de espécies reativas de oxigênio, interceptar o oxigênio livre, prevenir a iniciação da oxidação da primeira cadeia por eliminação de radicais iniciais, decompor produtos primários de oxidação a espécies não radicais além de atuar como quelantes de íons metálicos (quelatos) (ALSHIKH et al., 2015). Suspeita-se que um aumento no consumo de compostos fenólicos tem sido correlacionado com um risco reduzido de doenças cardiovasculares e certos tipos de cânceres (BRAVO, 1998; DUTHIE; CROZIER, 2000).

Em especial, o grupo dos estilbenos, também conhecidos como 1,2-difeniletileno, possuem um esqueleto de carbono e apresentam bioatividades potentes como efeitos antioxidantes e antibacterianos (KJUN KAWABATA, MANABU MISHIMA, 1991). Os estilbenos são também conhecidos como inibidores ativos da topoisomerase II, que causam o desenrolamento do DNA enrolado durante a transcrição celular (YAMADA et al., 2006). O pterostilbeno, é um exemplo representativo dos estilbenos e tem mostrado muitas bioatividades,

como efeitos antiinflamatórios, anti-diabéticos e cardioprotetores (KOSURU; SINGH, 2017; MACROPHAGES et al., 2018).

1.5 PTEROSTILBENO

O pterostilbeno (PTS) é um importante constituinte bioativo de algumas plantas como o mirtilo, uva, ameixa, amendoim dentre outros (KOSURU; SINGH, 2017). A cada 100g de mirtilo, por exemplo, podemos extrair 0,15 mg do PTS (RIMANDO et al., 2004). Pertence ao grupo dos estilbenoides onde atuam também como antimicrobianos, produzidos para proteger a planta contra infecções fúngicas e toxinas (LANGCAKE; PRYCE, 1976).

A fórmula química do PTS (trans-3,5-dimetoxi-4'-hidroxi estilbenos) mostra ser um análogo do éter dimetílico do resveratrol que pode ser encontrado em espécies de plantas como as espécies *Pterocarpus marsupium* (CHEMICAL, 1972). Acredita-se que a substituição dos grupos hidróxi por grupos metóxi aumentam a estabilidade e a lipofilia do composto PTS (Figura 3) em comparação com o resveratrol, o que leva a uma melhor permeabilidade da membrana, captação celular e biodisponibilidade (LIN; YUE; HO, 2009; TSAI; HO; CHEN, 2016).

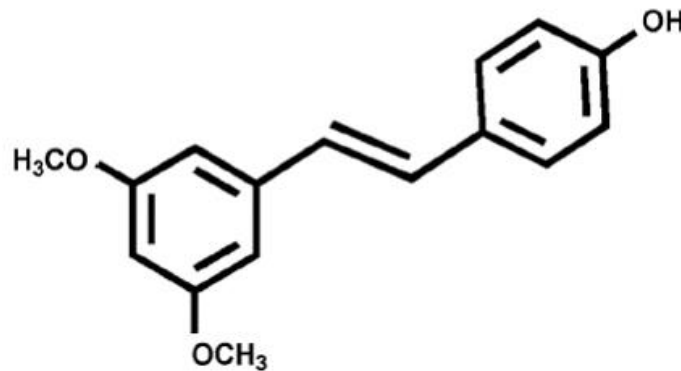


Figura 3. Estrutura química do pterostilbeno.
Fonte: adaptado de Kapetanovic et al, 2011.

O PTS exibe uma ampla gama de atividades biológicas, como anticâncer, antioxidante, antiinflamatório, e cardioprotetor que juntas contribuem para a prevenção de várias doenças humanas crônicas (DAS; MAULIK, 2006; MULAKAYALA et al., 2013; RIMANDO et al., 2002; ZHU et al., 2011). Um estudo de Perecko e colaboradores, mostrou que 10 μM de PTS poderiam inibir 92,05% da quimiluminescência do sangue total induzida pelo estresse oxidativo, enquanto o resveratrol apenas 67,83% (PEREČKO et al., 2008).

Além disso, um estudo clínico toxicológico mostrou que a administração máxima de PTS suportada, foi a de um ensaio clínico que mostrou que a dose de 125 mg duas vezes ao dia por 6 a 8 semanas era considerada segura e que não provocava reações adversas notáveis (RICHE et al., 2013).

Em um modelo animal de perfusão e isquemia, o PTS melhorou a função cardíaca e reduziu os marcadores de estresse oxidativo e inflamação (PEREČKO et al., 2008). Estes dados corroboram também com pesquisas onde resultados mostraram efeitos protetores do PTS em lesão de miocárdio, efeitos decorrentes da inibição da via de apoptose e atenuação de marcadores inflamatórios em modelo experimental de ratos (LV et al., 2015; WU et al., 2017).

Existem evidências que demonstram que o PTS atua como um antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo e aumentando o nível de antioxidante endógeno. Age como um antioxidante contra vários radicais livres, incluindo ânion superóxido e peróxido de hidrogênio de maneira dependente da concentração (ACHARYA; GHASKADBI, 2013). Além disso, o tratamento com PTS atenua a lesão por estresse oxidativo induzida pelo glutamato através da redução da produção de ROS, bem como pelo aumento da ativação de SOD e glutathione (GSH) (WANG et al., 2016). Lacerda e colaboradores constataram que a diminuição da produção de ânion superóxido dependente da oxidase e do estresse oxidativo pode ser o mecanismo no qual o PTS atua na cardioproteção, incluindo a prevenção da remodelação mal adaptativa e proteção da função sistólica no VD de ratos com HAP (LACERDA et al., 2017). O PTS também exerce atividade protetora sobre os danos da pele induzidos por raios ultravioleta tipo B (UVB) e a carcinogênese, mantendo as defesas antioxidantes da pele, incluindo os níveis de GSH, a atividade de catalase, superóxido e glutathione peroxidase (SIREROL et al., 2015).

Mesmo que os estilbenos, como o PTS, apresentem atividade biológica, seu potencial terapêutico pela via oral fica comprometido em virtude de uma baixa hidrossolubilidade. Essa característica apolar do PTS reduz sua solubilidade em água no ambiente gastrointestinal, prejudicando sua dissolução e, conseqüentemente, sua absorção e biodisponibilidade, o que limita seu uso como tratamento oral (LACERDA et al., 2017).

1.6 PTEROSTILBENO E CICLODEXTRINA

As ciclodextrinas (CDs), amplamente utilizadas na química molecular, são um grupo de oligossacarídeos formados por unidades de glicose unidas em um anel, onde mostram uma capacidade pertinente de formar complexos com moléculas de fármacos e drogas, além de

melhorar suas propriedades físico-químicas sem modificações moleculares (KFOURY; LANDY; FOURMENTIN, 2018; SAOKHAM et al., 2018).

O campo do encapsulamento molecular usando ciclodextrinas continua a crescer (CRINI, 2014). Entre as moléculas hospedeiras que foram complexadas por ciclodextrinas, podemos citar o resveratrol e o próprio pterostilbeno (Figura 4), onde alguns trabalhos sobre a complexação destes diferentes estilbenoides com CDs já foram recentemente publicados (ANTONIO et al., 2006; LACERDA et al., 2017). No entanto, ainda são muito escassos os trabalhos que demonstrem as aplicações biológicas desses complexos.

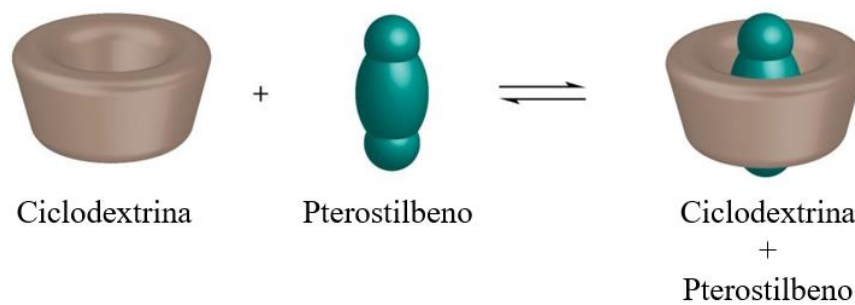


Figura 4. Ilustração esquemática da formação de um complexo de inclusão entre uma ciclodextrina e o pterostilbeno.
Fonte: adaptado de Kfoury et al., 2018.

As ciclodextrinas mais comuns e mais utilizadas são as ciclodextrinas α , β e γ , que contêm seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente (LOFTSSON, 2002). Apresentam uma natureza um tanto hidrofóbica, ao contrário da superfície exterior em que os grupos hidroxilas são expostos ao meio, tornando, assim, toda a molécula altamente solúvel em água (SONG et al., 2011). Compostos pouco solúveis em água como o PTS, ao formarem complexos com as ciclodextrinas seriam então capazes de aumentar sua biodisponibilidade além de proteger a molécula contra a ação de agentes externos (LIN; YUE; HO, 2009).

O estudo de Yeo e colaboradores enfatizou que a complexação com HPBCD aumenta em 60% a biodisponibilidade oral do PTS, comparado ao PTS em suspensão (YEO; HO; LIN, 2013). Além disso aumenta a biodistribuição deste composto, aumentando sua concentração tecidual tanto no pulmão quanto no coração, efeitos que podem favorecer seu potencial farmacológico (CHOO et al., 2014).

Tendo em vista o exposto, ainda que a administração do PTS apresente potencial terapêutico, sua atividade protetora em tecido pulmonar frente à HAP ainda não foi investigada. Portanto, faz-se necessário explorar as possíveis propriedades bioquímicas do PTS agora

complexado à hidroxipropil- β -ciclodextrina (complexo PTS:HP β CD) sobre alterações patológicas provocadas pela doença.

1.7 MODELO EXPERIMENTAL

Modelos animais tem contribuído muito para o atual entendimento da fisiopatologia e para a investigação de tratamentos experimentais na hipertensão pulmonar (MAARMAN et al., 2014). Muitas preocupações ainda existem com os modelos animais por não apresentarem a completa severidade da HAP observada em humanos em respeito a parâmetros histológicos e hemodinâmicos. Apesar dos modelos animais não recapitularem completamente a severidade da HAP, eles podem ser muito bem correlacionados com formas mais suaves e moderadas da HAP em humanos, um estágio que geralmente escapa no momento do diagnóstico (MAARMAN et al., 2014).

A monocrotalina (MCT) é um alcaloide pirrolizidínico presente nas plantas *Crotalaria spectabilis* (Figura 5A), facilmente encontradas em pastagens e plantações, uma vez que crescem em grandes quantidades em zonas tropicais e subtropicais (RYAN; MARSBOOM; ARCHER, 2013). Normalmente, tem sido utilizada em ratos com dose de 60-80mg/kg administrada via subcutânea ou intraperitoneal (GOMEZ-ARROYO et al., 2012b). A MCT é metabolizada no fígado pelo citocromo P450 (subtipo CYP3A4) em seu metabólito ativo, a dehidromonocrotalina (Figura 5B), é um agente alquilante altamente reativo que interage com o DNA e proteínas celulares. Dados da literatura sugerem que um dos alvos deste metabólito seja o complexo I da cadeia respiratória, e que esse teria maior afinidade pelo tecido pulmonar (GOMEZ-ARROYO et al., 2012a).

A



B

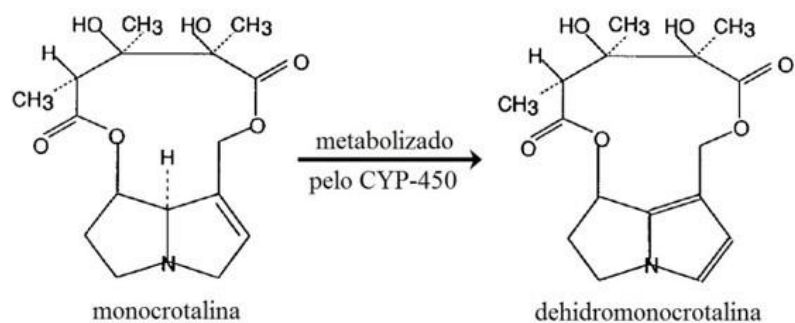


Figura 5. A) Foto da planta da *Crotalaria spectabilis*. Retirado do site College of Veterinary Medicine & Biomedical Sciences Colorado State University, 2018. B) Representação da metabolização da monocrotalina em dehidromonocrotalina pelo CYP-450.

Fonte: adaptado de Pereira et al., 1998.

A MCT é conhecida por causar hepatotoxicidade e HAP. Sua resposta varia perante as diferenças na farmacocinética envolvendo sua degradação e a formação hepática do seu derivado pirrólico ou excreção (Barman, Scott et al. 2009). Utiliza-se o rato como espécie preferida para o estudo da HAP induzida por MCT (NOGUEIRA-FERREIRA et al., 2015). Em apenas uma semana, os ratos apresentam anorexia, apatia e incapacidade de ganhar peso. À medida que a lesão pulmonar e o remodelamento vascular progredem, os ratos desenvolvem graus variáveis de dispnéia, fraqueza, diarreia e cianose periférica (SCHOENTAL; HEAD, 1955).

Embora o mecanismo exato através do qual a MCT provoca HAP não ser conhecido, dados da literatura observaram que o composto provoca lesão endotelial direta que, em seguida, leva a ativação do desenvolvimento e progressão severa e letal da doença (JASMIN et al., 2001).

Pouco mais de algumas horas após a exposição do animal ao alcalóide, já se observa danos no endotélio vascular. Na primeira semana, pode-se perceber um aumento do dano endotelial, com presença de infiltrado inflamatório e edema. Na segunda semana já se observa o aumento da mPAP (JAMES; ANNA, 2011). O dano endotelial é a alavanca inicial para a vasculite pulmonar e o remodelamento pulmonar obstrutivo, caracterizado pelo estreitamento ou obliteração do lúmen vascular.

É possível verificar em lâminas histológicas que a vasculatura pulmonar nesse modelo mostra hiperplasia da íntima, hipertrofia da camada média e engrossamento da camada adventícia (STENMARK et al., 2009). Dentre outros, se destacam hipertrofia do VD, aumento da espessura da camada média da artéria pulmonar, aumento da mPAP e inflamação vascular pulmonar (GOMEZ-ARROYO et al., 2012; POLONIO et al., 2012). Outros estudos realizados com o modelo de MCT também destacam o papel essencial de células inflamatórias (macrófagos, células dendríticas e mastócitos) e citocinas (interleucinas 1 e 6) nos estágios iniciais do remodelamento vascular observado na HAP (DAHAL et al., 2011; SAVAI et al., 2012). A MCT não somente causa danos às artérias pulmonares, mas também é autora da indução de edema alveolar e fibrose intersticial pulmonar

Sendo assim, existem diversos modelos experimentais para estudar a HAP, e o modelo da MCT é utilizado com frequência, uma vez que ele oferece simplicidade técnica, reprodutibilidade e baixo custo quando comparado com outros modelos (GOMEZ-ARROYO et al., 2012).

2 JUSTIFICATIVA

A HAP é uma condição clínica grave, altamente debilitante e com evolução progressiva. Nesta doença, o remodelamento da vasculatura pulmonar acarreta estreitamento, resistência e aumento da pressão nas artérias pulmonares, dificultando a passagem de sangue e as trocas gasosas. Consequentemente, o VD fica sobrecarregado e o quadro de insuficiência cardíaca é instalado, sendo a principal causa de morte dos pacientes. Na fisiopatologia da HAP, o estresse oxidativo exerce um importante papel deletério associado a um sistema antioxidante deficiente. Diante disso a utilização de moléculas com potencial antioxidante torna-se relevante. Recentemente mostramos os efeitos antioxidantes e funcionais do PTS na insuficiência cardíaca direita secundária a HAP. Portanto, explorar os efeitos do PTS sobre o pulmão hipertenso poderá elucidar se os efeitos terapêuticos deste fitoquímico encontrados até então, podem ser decorrentes somente de seus efeitos diretos sobre o VD ou associado aos efeitos benéficos sobre o tecido pulmonar. Visto isso, surge como uma interessante alternativa de tratamento na tentativa de manter a função pulmonar, além de prevenir a progressão da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do pterostilbeno complexado a ciclodextrina (complexo PTS:HP β CD) sobre a resistência vascular e parâmetros oxidativos no tecido pulmonar em modelo de HAP.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estimar o efeito do complexo PTS:HP β CD sobre a RVP através da razão entre o tempo de aceleração (TAC) pelo tempo de ejeção (TEJ) da artéria pulmonar, por ecografia;
- b) Estimar o efeito do tratamento sobre os níveis de óxido nítrico (NO) no tecido pulmonar, através da determinação dos níveis de nitritos;
- c) Estimar o efeito do complexo PTS:HP β CD no dano oxidativo, através dos níveis de lipoperoxidação e oxidação de proteínas, em homogeneizado de tecido pulmonar, em modelo de HAP;
- d) Avaliar a ação do complexo PTS:HP β CD nos níveis de EROs totais, NADPH Oxidase e a concentração de H₂O₂ no tecido pulmonar, em modelo de HAP;
- e) Avaliar o efeito do complexo PTS:HP β CD sobre os níveis de antioxidantes não enzimáticos no tecido pulmonar, em modelo de HAP;
- f) Avaliar o efeito do tratamento com o complexo PTS:HP β CD sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Pterostilbeno atenua parâmetros oxidativos e ecográficos em pulmão de ratos com hipertensão arterial pulmonar

Alexandre R. Hickmann¹, Schauana Freitas¹, Denise dos Santos Lacerda^{1,2}, Adriane Belló-Klein¹, Alex Sander da Rosa Araujo^{1,2*}

¹ Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica; Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Autor Correspondente: Rua Sarmento Leite 500. CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.
Telefone: +55 (51) 3308 3621.

E-mails: alexandrehickmann@gmail.com (A. R. Hickmann),
cristinacamposcarraro@gmail.com (C. C. Carraro), schauanafreitas@gmail.com (S. Freitas),
denidsl@yahoo.com.br (D. S. Lacerda), belklein@ufrgs.br (A. Belló-Klein),
alsanderaraujo@hotmail.com (A. S. R. Araujo).

RESUMO

A Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP) é uma patologia grave caracterizada por modificações bioquímicas, morfofuncionais e estruturais, que leva ao remodelamento vascular com subsequente aumento da resistência vascular pulmonar (RVP) e pressão média da artéria pulmonar (mPAP). Em resposta ao aumento da pós-carga, o ventrículo direito (VD) sofre hipertrofia e conseqüente insuficiência cardíaca (IC). Atualmente, sabe-se que o uso de fitoterápicos ajudam a atenuar a progressão da IC. Em virtude disso, o objetivo desse estudo foi avaliar o desempenho do fitofenol pterostilbeno complexado a ciclodextrina (PTS:HP β CD) sobre parâmetros ecográficos e oxidativos em tecido pulmonar no modelo experimental de HAP induzida pela monocrotalina.

Para isso, ratos Wistar machos foram divididos em 3 grupos: controle (CTR), monocrotalina (HAP), e monocrotalina + PTS:HP β CD (HAP+PTS). A HAP foi induzida através de uma dose única de monocrotalina (60 mg/kg,i.p.). Após 7 dias, os animais foram tratados por 14 dias com PTS:HP β CD (100 mg/kg, i.p.) ou veículo. Ao final do tratamento, foram avaliados dados ecográficos de RVP, mPAP e fluxo sanguíneo através da razão do tempo de aceleração e tempo de ejeção na artéria pulmonar (TAC/TEJ), Após a eutanásia dos animais foram coletados os pulmões. No tecido pulmonar, foram analisados a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), atividade de enzimas antioxidantes e lipoperoxidação.

O fitoquímico pterostilbeno não apresentou efeitos sobre a RVP assim como a mPAP, contudo foi capaz de recuperar parcialmente o fluxo sanguíneo na artéria pulmonar, possivelmente através da modulação de enzimas antioxidantes que reduziram parcialmente os níveis de peróxido de hidrogênio. O tratamento com PTS:HP β CD diminuiu os níveis de EROs e peróxido de hidrogênio, evidenciando o papel antioxidante da GPx, além de diminuir a atividade da SOD. Esses resultados mostram que esse tratamento parece estar causando diferentes alterações em tecido pulmonar que podem apresentar impacto direto nas mudanças que já foram evidenciadas no VD.

Palavras-chave: Hipertensão arterial pulmonar. Pterostilbeno. Monocrotalina. Pulmão. Estresse oxidativo.

INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) apresenta-se como uma doença de remodelamento vascular que gera aumento da resistência vascular pulmonar (RVP) e da pressão média da arterial pulmonar (mPAP) [1]. Nesta doença, ocorre a perda da capacidade do leito vascular pulmonar de se dilatar e recrutar uma vasculatura não utilizada para acomodar aumentos no fluxo sanguíneo. Essa vasoconstrição severa reflete em um aumento da mPAP e à hipertrofia do ventrículo direito (VD) em resposta à elevação da pós-carga [2]. Essa vasoconstrição persistente é percebida em sintomas como a dispneia e a intolerância ao exercício [3], frequentes nos pacientes, que ocorrem devido à dificuldade nas trocas gasosas associadas a um desequilíbrio na relação ventilação/perfusão, assim como a um reduzido retorno venoso e débito cardíaco [4].

A HAP é uma doença crônica e estima-se que sua incidência mundial ocorra em torno de 10 a 52 casos por milhão de habitantes, com maior incidência na sexta década de vida [5,6]. A HAP é descrita como uma irregularidade circulatória devido aos mecanismos que envolvem vasoconstrição e remodelamento de pequenas artérias e arteríolas pulmonares, com subsequente aumento do tônus vascular e RVP [7]. Em decorrência da vasoconstrição e do aumento da RVP, todas as diferentes categorias da HAP são caracterizadas por vasoconstrição pulmonar excessiva junto de um processo de remodelamento vascular anormal que usualmente afeta todas as camadas do vaso e resulta em severa perda de área de secção transversal. No pulmão são encontradas mudanças na túnica íntima que incluem dano endotelial, proliferação de células endoteliais, invasão da íntima por células tipo miofibroblastos, aumento da deposição de matriz extracelular levando à fibrose e, muitas vezes, obstrução do lúmen vascular em decorrência das lesões plexiformes [8]. Como consequência, há um aumento da RVP, que resulta em sobrecarga de pressão no coração. Além disso, a artéria pulmonar apresenta complacência diminuída, o que também contribui para o aumento de trabalho e a distensão do VD [9].

Estudos demonstraram que o estresse oxidativo também atua como mediador da HAP e da disfunção endotelial associada. De fato, um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) também contribui para a disfunção vascular no pulmão [10].

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e de defesas antioxidantes, em favor dos primeiros [11]. Análises recentes apontam que o estresse oxidativo é um potente mediador da HAP e das mudanças patológicas associadas à vasculatura pulmonar [12]. Como fontes geradoras de espécies reativas de oxigênio (EROs) na parede vascular, podemos citar a NADPH oxidase que é uma das fontes endógenas mais

importantes de espécies reativas de oxigênio no organismo, que catalisa a transferência de um elétron do NADPH para o O_2 , formando o $O_2^{\cdot-}$, além também da xantina oxidase, enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e a eNOS desacoplada [13–15].

O modelo experimental utilizado neste trabalho envolveu a monocrotalina, um alcalóide do grupo das pirrolizidinas, presente em plantas do gênero *Crotalaria* [16]. Seu metabólito ativo, a deidromonocrotalina, tem alta afinidade pelos eritrócitos no fígado, aumentando o trânsito desse metabólito para os pulmões, onde é liberado no endotélio pulmonar [17]. Assim, a deidromonocrotalina dá início ao remodelamento vascular no tecido pulmonar, além do processo de estresse oxidativo presente na HAP [18].

A administração do pterostilbeno (PTS) tem apresentado visibilidade, em parte, devido a sua capacidade sequestradora de espécies reativas e aumento da expressão de enzimas antioxidantes [19]. O tratamento com o PTS em animais submetidos a HAP através do modelo experimental de monocrotalina (MCT) parece levar a uma melhora dos parâmetros morfológicos e funcionais do coração, assim como parece modificar a expressão proteica tecidual dos mesmos. Esses efeitos contribuem para a melhora da função cardíaca [20].

Suplementarmente, existem outros mecanismos farmacológicos do PTS que têm sido observados, como sua ação hipoglicemiante (por aumento da glicólise e redução da gliconeogênese) apresentando, assim, um efeito antidiabético, onde temos um aumento nos níveis de insulina plasmática [21]. O PTS também possui efeito anti-inflamatório, observado pela baixa indução das enzimas óxido nítrico sintase indutível (iNOS) e cicloxigenase-2 (COX-2), bem como pela redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias [22].

Mesmo que os estilbenos, como o PTS, apresentem atividade biológica, seu potencial terapêutico fica comprometido em virtude de uma baixa hidrossolubilidade que estas moléculas apresentam em sistemas biológicos [23]. Dessa forma, estratégias farmacotécnicas são necessárias para aumentar a hidrossolubilidade deste composto, através da formação de complexos de inclusão com hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD). As ciclodextrinas possibilitam o aumento da hidrossolubilidade aparente desses compostos lipofílicos sem diminuir de suas propriedades biológicas [24].

Em vista disso, apesar do tratamento com o PTS ter mostrado benefícios ao VD não está claro se estes efeitos se deram apenas por efeitos sobre o remodelamento do VD, ou se foi associado a melhora da função pulmonar na HAP [20]. Nesse sentido, a avaliação de parâmetros funcionais e oxidativos no tecido pulmonar torna-se relevante e contribui para o entendimento dos mecanismos farmacológicos deste composto em modelo de HAP, uma intervenção nunca antes investigada. Portanto, faz-se necessário explorar as possíveis propriedades bioquímicas

do PTS complexado à HP β CD (PTS:HP β CD) sobre alterações patológicas provocadas pela HAP.

MATERIAIS E MÉTODOS

APROVAÇÃO ÉTICA

Os procedimentos realizados neste trabalho estão de acordo com os padrões éticos do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFRGS (protocolo de aprovação número 28218) referente à proteção dos animais utilizados para fins científicos.

ANIMAIS

Para este estudo, cerca de 30 ratos Wistar machos foram utilizados, pesando em média 250 g. Durante o período de experimentação (21 dias), os animais foram alojados no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS, sendo mantidos em caixas plásticas (270 x 260 x 310 mm), com o assoalho coberto com serragem. Os animais, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS, receberam água e ração comercial à vontade e foram mantidos em temperatura (20 a 25°C) e umidade (70%) controladas e ciclo claro-escuro de 12 horas.

GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em 3 grupos: **1) CTR:** animais que receberam apenas solução veículo (HP β CD); **2) HAP:** animais que receberam MCT para indução da HAP e que foram tratados com solução veículo (HP β CD); **3) HAP+PTS:** animais que receberam MCT para indução da HAP e tratamento com PTS:HP β CD.

Os ratos dos grupos HAP e HAP+PTS foram induzidos à hipertensão pulmonar, onde receberam, através de via intraperitoneal (i.p.), uma dose única de MCT (60 mg/kg) [25]. Os animais controle (CTR) receberam o mesmo volume de solução veículo [26,27]. Após 7 dias da indução, os animais HAP+PTS receberam o complexo PTS:HP β CD, na dose de 100 mg/kg, por um período de 14 dias. Os demais animais (CTR e HAP) receberam apenas a solução veículo (solução aquosa de hidroxipropil- β -ciclodextrina) para serem submetidos às mesmas condições experimentais. Ao final do período experimental, os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) [28] administrados simultaneamente [29].

Foram feitas análises ecográficas, cateterismo cardíaco e, posteriormente, os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina manual, com subsequente coleta do órgão de estudo, o pulmão.

ANÁLISES ECOGRÁFICAS

Após 21 dias, foi realizada a análise ecográfica dos animais. Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (90 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, via i.p.) e posicionados em decúbito lateral para a obtenção das imagens. Foi utilizado o sistema de ultrassom Philips HD XE com um transdutor de 12-13 MHz. O tempo de aceleração do fluxo na artéria pulmonar e o tempo de ejeção do fluxo na artéria pulmonar foram medidos por ecografia Doppler [30]. A RVP foi estimada através da fórmula $RVP = PSAP - PCP / Qp$, onde PSAP = Pressão sistólica da artéria pulmonar, em mmHg, PCP = Pressão média capilar pulmonar, em mmHg e Qp = Débito pulmonar, em litros/min [31].

ANÁLISE HEMODINÂMICA

Após a ecografia, ainda sob os efeitos do anestésico geral, os animais foram encaminhados para a realização do cateterismo da artéria pulmonar. Iniciamos com a imobilização do animal em uma prancha operatória, posicionando-o em decúbito dorsal, com seus membros superiores e inferiores fixados em abdução com fita crepe.

Neste procedimento, os animais foram submetidos à tricotomia da região da jugular direita, e o campo cirúrgico desinfetado (álcool 70% iodado). A jugular foi dissecada e isolada. O fluxo sanguíneo foi bloqueado através do uso de um oclisor metálico. Com o fluxo obstruído, rapidamente foi realizada uma incisão na parede superior do vaso, a fim de permitir a introdução de um cateter de polietileno PE-50 preenchido com solução salina (0,9% NaCl). O cateter foi inserido até o ventrículo direito e sua posição foi determinada pela observação da característica onda de pressão ventricular. Logo após este registro inicial, seguido de 5 minutos de estabilização, a pressão ventricular sistólica direita e a pressão diastólica final do ventrículo direito foram registradas. Os sinais analógicos da pressão foram digitalizados (Windaq-Data Acquisition System, PC) com taxa de amostragem de 1000 Hz, expressos em mmHg. A partir da derivação da onda de pressão ventricular direita e detecção de pontos máximos e mínimos a cada ciclo cardíaco, foram obtidos os valores da derivada de contração (dp/dt_{max}) e da derivada de relaxamento (dp/dt_{min}), respectivamente, sendo esses expressos em mmHg/s. A mPAP foi

calculada pelo seguinte cálculo: $mPAP \text{ (mmHg)} = 0,61 * PVSD + 2$, onde PVSD = Pressão sistólica do VD [32].

PREPARAÇÃO DOS TECIDOS

As amostras de tecido pulmonar destinadas às análises bioquímicas foram homogeneizadas por 40 segundos em homogeneizador Ultra-turrax com solução de KCl 1,15% adicionado de fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) na concentração de 1 mM. Após centrifugação do homogeneizado a 3000 rpm por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer (-80°C) para futuramente determinação dos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo.

ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Determinação da concentração proteica

A concentração de proteína no homogeneizado de pulmão foi determinada pelo método de Lowry [33], onde se utiliza a albumina de soro bovino como padrão. A medida foi efetuada em espectrofotômetro a 625 nm e os resultados expressos em mg/ml.

Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio Totais

As espécies reativas de oxigênio totais foram avaliadas espectrofluorimetricamente através da oxidação do diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) na presença de 2,7-diclorofluoresceína. As amostras foram excitadas em 488 nm e a emissão foi coletada em 525 nm. Os resultados foram expressos em nmoles/mg de proteína [34].

Determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio

Os níveis de peróxido de hidrogênio foram medidos através da oxidação do vermelho de fenol, resultando num produto cuja leitura foi efetuada em 610 nm. Os resultados foram expressos em nmoles de H_2O_2 /mg de proteína [35].

Atividade da NADPH Oxidase

A atividade da enzima foi determinada em homogeneizado de pulmão mediante técnica espectrofotométrica, seguindo o consumo de NADPH a 340 nm. No homogeneizado foi adicionado tampão fosfato 100 mmol/L pH 7,4 e NADPH 1 mg/mL. Os resultados foram expressos em nmol NADPH/min.mg proteína [15].

Atividade de enzimas antioxidantes

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada por meio da auto-oxidação do pirogalol, medida a 420 nm [36]. Os resultados foram expressos em unidades de SOD/mg de proteína. A atividade da catalase (CAT) foi analisada por meio do consumo de peróxido de hidrogênio em cubetas de quartzo [37], medida a 240 nm. Os resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteína. A atividade da glutatona peroxidase (GPx) foi avaliada por meio do consumo de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), medida a 340 nm [38]. Os resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteína.

Determinação da lipoperoxidação por espectrofotometria

A peroxidação lipídica foi medida colorimetricamente por meio da medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) [2,39]. O homogeneizado foi misturado com o ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% e aquecido em banho-maria a 95°C por 60 minutos. Nessas condições, o TBA reage com os peróxidos lipídicos do tecido para formar malondialdeído (MDA), que é medido a 532 nm. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/mg de proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar do MDA de 1,56 M/cm.

Determinação da peroxidação lipídica por quimiluminescência

A peroxidação lipídica também foi avaliada em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden). Os homogeneizados de tecido foram colocados em vials contendo baixo potássio, numa concentração de 0,5 mg/mL, num meio de reação que consiste em tampão fosfato 20 mmol/L e 140 mmol/L de KCl (pH = 7,4). A reação foi estimulada pela adição de 3 mM de terc-butil-hidroperóxido (tBOOH). Os resultados foram expressos em contagens por segundo por miligrama de proteína (cps/mg de proteína) [40].

Nitritos Totais (NO₂⁻)

A quantidade total de NO₂⁻ foi avaliada pela reação deste com o reagente de Griess, que forma um composto corado. Essa reação foi iniciada pela adição de 100 µl do reagente de Griess, sendo a coloração final detectada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 540 nm e os resultados expressos em mmol/L [41].

Determinação do conteúdo de sulfidrilas

Foram adicionados 0,1 mM de DTNB a 15 uL de homogeneizado, que foram incubados durante 30 min à temperatura ambiente no escuro [42]. A absorvância (medição da formação do TNB) foi medida espectrofotometricamente a 412 nm (Anthos Zenyth 200 RT, Biochrom, Reino Unido) e os resultados foram expressos como nanomoles de TNB/mg de proteína (nmol/mg proteína).

Análise estatística

A comparação entre dados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, complementado pelo pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou um $P < 0,05$. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. O software GraphPad Prism, versão 6, foi utilizado como ferramenta computacional para análise estatística dos dados.

RESULTADOS

ANÁLISES ECOGRÁFICAS

Após 21 dias da indução da HAP, os grupos HAP e HAP+PTS apresentaram diferença significativa em relação ao grupo CTR. Tal diferença foi o aumento da RVP nos grupos HAP e HAP+PTS ($P < 0,05$) (Figura 1A). O tratamento com PTS:HP β CD não obteve melhora destas alterações. O índice TAC/TEJ que estava diminuído nos grupos com HAP em relação ao grupo CTR, apresentou aumento parcial no grupo para indução da HAP+PTS em relação ao grupo HAP mas não levando a níveis normais de controle ($P < 0,05$) (Figura 1B).

ANÁLISE HEMODINÂMICA

Em relação ao cateterismo da artéria pulmonar, os grupos HAP e HAP+PTS também apresentaram diferença significativa em relação ao grupo CTR. Tal diferença foi o aumento da mPAP nos grupos HAP e HAP+PTS ($P < 0,05$) (Figura 2). O tratamento com PTS:HP β CD não melhorou estas alterações.

PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Os animais do grupo HAP tiveram um aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio totais em relação ao grupo CTR ($P < 0,05$) (Figura 3A). O grupo tratado com

PTS:HP β CD apresentou uma redução significativa nos níveis de espécies reativas de oxigênio totais no tecido pulmonar, em relação ao grupo doente (HAP), se igualando aos parâmetros do controle ($P<0,05$). Além disso, o tratamento com PTS:HP β CD reduziu parcialmente os níveis de peróxido de hidrogênio nos animais do grupo HAP+PTS, em relação ao grupo doente (HAP) ($P<0,05$) (Figura 3B). Os animais do grupo HAP e HAP+PTS obtiveram aumentos significativos da atividade da enzima NADPH oxidase em relação ao grupo controle, sendo a administração do PTS:HP β CD incapaz de normalizar esta atividade (Figura 3E). Em relação ao conteúdo das sulfidrilas, foi observada diferença significativa entre os grupos HAP e HAP+PTS em relação ao grupo CTR (Figura 5A). Quanto à avaliação dos níveis de nitritos totais (Figura 5B), e os níveis de peroxidação lipídica (quimiluminescência e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($P<0,05$) (Figura 3C e 3D).

ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A atividade da SOD não apresentou diferença no grupo doente (HAP) em relação ao grupo controle (CTR) ($P<0,05$). Porém a SOD diminuiu no grupo tratado (HAP+PTS), em comparação ao grupo HAP (Figura 4A). Em relação à atividade da CAT, obtivemos redução da atividade da CAT entre os grupos HAP e HAP+PTS em relação ao grupo CTR ($P<0,05$) (Figura 4B). Em relação à GPx, obtivemos um aumento de sua atividade no grupo HAP e uma diminuição parcial da atividade da enzima no grupo que recebeu o tratamento com PTS:HP β CD, contudo, não reduzindo a níveis normais quando comparados ao grupo CTR ($P<0,05$) (Figura 4C).

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstram, pela primeira vez, os efeitos do fitoquímico pterostilbeno complexado com a ciclodextrina (complexo PTS:HP β CD) sobre parâmetros funcionais e oxidativos em tecido pulmonar com modelo experimental de HAP. As mudanças encontradas no VD são alvo de estudos contemporâneos, entretanto, são poucos os estudos que demonstram a perda da homeostase do tecido pulmonar e sua modulação a partir de novas abordagens terapêuticas. Foram analisados os efeitos do PTS:HP β CD na dose de 100 mg/kg sobre componentes funcionais, além de mecanismos envolvidos no estresse oxidativo, como os precursores do desequilíbrio redox e enzimas antioxidantes, em tecido pulmonar em modelo de HAP.

O PTS foi capaz de diminuir as espécies reativas de oxigênio, além de melhorar parcialmente o fluxo sanguíneo pela artéria pulmonar.

O modelo experimental de HAP induzida por MCT consegue reproduzir as principais características da HAP idiopática em humanos [43]. A administração deste alcaloide levou à disfunção endotelial e consequente remodelamento das artérias e arteríolas pulmonares, resultando no aumento da RVP e mPAP [44]. Dados da literatura mostram que o aumento da RVP induz uma sobrecarga no VD, que sofre hipertrofia mal-adaptativa que evolui para a insuficiência cardíaca, quadro característico da doença, denominado *Cor pulmonale* [27]. Sendo assim, as alterações bioquímicas e morfológicas encontradas no presente estudo estão de acordo com a literatura, corroborando que este modelo foi reproduzido com sucesso [10,18].

A HAP promove danos às artérias e arteríolas pulmonares, promovendo um aumento da mPAP e, conseqüentemente, aumento da RVP, levando a uma diminuição do fluxo sanguíneo nesses vasos [45]. Neste trabalho foi observado uma diminuição na razão TAC/TEJ em relação ao grupo HAP. O tempo de aceleração (TAC) é medido como pico de velocidade da regurgitação pela tricúspide. Além disso, a valva semilunar pulmonar tende a fechar prematuramente em resposta a um aumento da mPAP, fazendo com que o pico de velocidade seja alcançado mais cedo durante a sístole na HAP. O aumento de mPAP também leva a um prolongado período de ejeção (TEJ) nesses animais. Conforme a literatura, alterações na razão TAC/TEJ, em conjunto com hipertrofia do VD são considerados indicativos de HAP [46]. A diminuição da razão TAC/TEJ sugere que neste estudo, aos 21 dias após a exposição à MCT, os animais já apresentavam, indícios de melhora no fluxo sanguíneo, apesar de ainda não apresentarem mudanças na resistência e pressão pulmonar.

Níveis aumentados de EROs podem estar relacionadas ao aumento da atividade das NADPH oxidases, que estão associadas à produção de elevados níveis de ânion superóxido e, posteriormente, ocorre a dismutação desse ânion superóxido e formação de H₂O₂ pela enzima superóxido dismutase (SOD). Estes fatores são muito comuns na HAP, acarretando em desequilíbrio redox e, conseqüentemente, estresse oxidativo [47,48]. As enzimas GPx e CAT impedem o acúmulo de H₂O₂, promovendo sua catálise, formando H₂O [36]. Neste estudo, foi encontrado aumento da atividade da GPx nos animais que receberam MCT, porém foi observado uma diminuição na atividade da CAT nesse grupo. Assim, parece ter ocorrido um desequilíbrio redox leve, uma vez que a CAT, geralmente recrutada em níveis altos de H₂O₂ [49] estava com a atividade diminuída nos grupos tratados com MCT. Assim, temos principalmente a atividade da GPx envolvida e não da CAT. Isso é explicado pela literatura, onde sabe-se que a enzima GPx é estimulada na presença de estresse oxidativo leve. E só

quando em maiores concentrações, caso a GPx não seja a intermediária, a CAT é a enzima que atua sobre o H₂O₂ [38]. Além disso, as sulfidrilas, antioxidantes endógenos caracterizados pela presença de grupamentos tiois (-SH), estavam diminuídas quando comparadas ao controle. Este fato pode ser explicado devido ao fato das sulfidrilas reagirem com as EROs formados pela HAP, na tentativa de neutralizar e proteger contra o estresse oxidativo. Quando realizada a avaliação dos nitritos, produtos de degradação de NO e outra fonte de radicais livres no organismo, não houve diferenças significativas entre os grupos. Este fato poderia justificar a ausência de dano lipídico, avaliado pelas medidas de TBARS e quimiluminescência, nos animais com HAP, uma vez que estas espécies reativas são, muitas vezes, responsáveis pela oxidação dos lipídeos de membrana [50]. Assim, uma hipótese para isso é que o aumento nos níveis de nitritos poderia estar mais associado a sua função vasodilatadora do NO, que poderia explicar a melhora do fluxo sanguíneo (TAC/TEJ) da artéria pulmonar mostrado pelos dados ecográficos.

Em uma pesquisa recente, o PTS promoveu, em *cor pulmonale*, um papel importante na fisiopatologia e progressão da doença [20]. A administração de PTS, parece ser uma boa opção terapêutica para pacientes com HAP. No estudo, o complexo PTS:HPβCD preveniu o remodelamento cardíaco e protegeu a função sistólica no VD de ratos com HAP. Esses mecanismos cardioprotetores podem estar relacionados, em parte, ao potencial antioxidante do PTS, favorecido pelo aumento de sua absorção promovida pela presença de HPβCD no complexo [20].

No estudo vigente, os animais com HAP tratados com PTS apresentaram redução nos níveis de EROs Totais. Esse efeito é importante, pois as EROs em alta concentração participam da fisiopatologia da doença pulmonar, promovendo danos celulares por meio da oxidação de lipídios e proteínas, [51,52]. A redução das EROs totais no tecido pulmonar causada pela administração do complexo PTS:HPβCD pode estar relacionada à capacidade redutora do hidroxil fenólico da PTS, que doa um elétron a espécies radicais, estabilizando-as [53,54]. O composto fenólico também pode atuar como agente quelante para metais como o ferro (Fe²⁺) e para o cobre (Cu²⁺), inibindo assim, a reação de Fenton e Haber-Weiss e, conseqüentemente, a produção de ROS, contribuindo para a proteção contra a lipoperoxidação [53,55]. Corroborando com nossos resultados, outros autores também destacam o efeito antioxidante do PTS na insuficiência cardíaca direita, onde a administração oral do complexo PTS:HPβCD é capaz de reduzir a produção de EROs associada ao efeito indutor da resposta antioxidante, resultando na proteção da função sistólica [20]. Contudo, o tratamento não mostra benefícios na RVP nem na mPAP mesmo apresentando uma melhora parcial do TAC/TEJ. Relacionando

ao estresse oxidativo, o que aparenta, é que a melhora parcial do H_2O_2 parece estar indicando que se os níveis de H_2O_2 melhorassem por completo, a índices normais de controle, o fluxo sanguíneo melhoraria por inteiro, dando a entender que com a administração de PTS há uma melhora parcial da função pulmonar.

Desse modo, o trabalho demonstra que o PTS:HP β CD foi capaz de melhorar parcialmente o fluxo sanguíneo além de modular mecanismos antioxidantes. De modo geral, os efeitos do PTS foram benéficos para o tecido pulmonar. Sua função bioquímica no pulmão, como vasodilatador, poderia ter contribuído para um impacto direto no VD. A partir disso, dados da literatura ajudam a fortalecer o papel positivo do PTS no remodelamento cardíaco na HAP [20]. O tratamento de animais submetidos a HAP através do modelo experimental de MCT parece contribuir para a melhora dos parâmetros morfológicos e funcionais do coração, sinalizando para uma melhora da função cardíaca. Mais estudos são necessários para avaliação dos exatos mecanismos pelos quais o PTS exerce seus efeitos protetores no pulmão. Por fim, uma melhor avaliação das estruturas moleculares da NADPH oxidase, acompanhado da mensuração dos níveis do ânion superóxido e análises de modulação da expressão de receptores de endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) poderão somar no entendimento dos efeitos benéficos do PTS no pulmão em animais com HAP.

AGRADECIMENTOS

Financiamento: Esse trabalho teve apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse para a publicação deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- [1] S. Malenfant, A.S. Neyron, R. Paulin, F. Potus, J. Meloche, S. Provencher, S. Bonnet, Signal transduction in the development of pulmonary arterial hypertension, *Pulm Circ.* 3 (2013) 278–293. doi:10.4103/2045-8932.114752\PC-3-278 [pii].
- [2] E.D. Austin, T. Lahm, J. West, S.P. Tofovic, A.K. Johansen, M.R. Maclean, A. Alzoubi, M. Oka, Gender, sex hormones and pulmonary hypertension., *Pulm. Circ.* 3 (2013) 294–314. doi:10.4103/2045-8932.114756.
- [3] A.A. Weinstein, L.M.K. Chin, R.E. Keyser, M. Kennedy, S.D. Nathan, J.G. Woolstenhulme, G. Connors, L. Chan, Effect of aerobic exercise training on fatigue and physical activity in patients with pulmonary arterial hypertension, *Respir. Med.* 107 (2013) 778–784. doi:10.1016/j.rmed.2013.02.006.
- [4] H. Groepenhoff, A. Vonk-Noordegraaf, M.C. van de Veerdonk, A. Boonstra, N. Westerhof, H.J. Bogaard, Prognostic Relevance of Changes in Exercise Test Variables in Pulmonary Arterial Hypertension, *PLoS One.* 8 (2013) 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0072013.
- [5] D.G. Kiely, C.A. Elliot, I. Sabroe, R. Condliffe, Pulmonary hypertension: diagnosis and management, *BMJ Br. Med. J.* 346 (2013). <http://www.bmj.com/content/346/bmj.f2028.abstract>.
- [6] A.J. Peacock, N.F. Murphy, J.J. V. McMurray, L. Caballero, S. Stewart, An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension, *Eur. Respir. J.* 30 (2007) 104–109. doi:10.1183/09031936.00092306.
- [7] V. V. McLaughlin, S.J. Shah, R. Souza, M. Humbert, Management of pulmonary arterial hypertension, *J. Am. Coll. Cardiol.* 65 (2015) 1976–1997. doi:10.1016/j.jacc.2015.03.540.
- [8] B.K. Dahal, D. Kosanovic, C. Kaulen, T. Cornitescu, R. Savai, J. Hoffmann, I. Reiss, H.A. Ghofrani, N. Weissmann, W.M. Kuebler, W. Seeger, F. Grimminger, R.T. Schermuly, Involvement of mast cells in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats, *Respir. Res.* 12 (2011) 60. doi:10.1186/1465-9921-12-60.
- [9] Y.-C. Lai, K.C. Potoka, H.C. Champion, A.L. Mora, M.T. Gladwin, Pulmonary Arterial Hypertension: The Clinical Syndrome, *Circ. Res.* 115 (2014) 115–130. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.301146.
- [10] B.G. de Lima-Seolin, M.M. Hennemann, R.O. Fernandes, R. Colombo, J.H.P. Bonetto, R.B. Teixeira, N. Khaper, A.E.G. Godoy, I.E. Litvin, A. Sander da Rosa Araujo, P.C. Schenkel, A. Belló-Klein, Bucindolol attenuates the vascular remodeling of pulmonary arteries by modulating the expression of the endothelin-1 A receptor in rats with pulmonary arterial hypertension, *Biomed. Pharmacother.* 99 (2018) 704–714. doi:10.1016/j.biopha.2018.01.127.
- [11] P.A. MacCarthy, A.M. Shah, Oxidative stress and heart failure, *Coron. Artery Dis.* 14 (2003). https://journals.lww.com/coronary-artery/Fulltext/2003/04000/Oxidative_stress_and_heart_failure.3.aspx.
- [12] C. Campos, A.L. De Castro, A.M.V. Tavares, R.O. Fernandes, V.D. Ortiz, T.E. Barboza, C. Pereira, M. Apel, O.S. Da Silva, S. Llesuy, A.S. Da Rosa Araujo, A. Belló-Klein, Effect of free and nanoencapsulated copaiba oil on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 69 (2017) 79–85. doi:10.1097/FJC.0000000000000442.

- [13] V.I. Lushchak, Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification, *Chem. Biol. Interact.* 224 (2014) 164–175. doi:10.1016/j.cbi.2014.10.016.
- [14] A.C. Montezano, R.M. Touyz, Reactive Oxygen Species and Endothelial Function - Role of Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Nox Family Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 110 (2012) 87–94. doi:10.1111/j.1742-7843.2011.00785.x.
- [15] Y. Wei, J.R. Sowers, R. Nistala, H. Gong, G.M.E. Uptergrove, S.E. Clark, E.M. Morris, N. Szary, C. Manrique, C.S. Stump, Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 35137–35146. doi:10.1074/jbc.M601320200.
- [16] R. Schoental, M.A. Head, Pathological changes in rats as a result of treatment with monocrotaline, *Br. J. Cancer.* 9 (1955) 229–237. doi:10.1038/bjc.1955.19.
- [17] 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. doi:10.1016/S0041-008X(05)80016-X.
- [18] 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. doi:10.1016/0026-2862(89)90017-4.
- [19] D. McCormack, D. McFadden, Pterostilbene and cancer: current review., *J. Surg. Res.* 173 (2012) e53-61. doi:10.1016/j.jss.2011.09.054.
- [20] D. dos Santos Lacerda, P. Türck, B. Gazzi de Lima-Seolin, R. Colombo, V. Duarte Ortiz, J.H. Poletto Bonetto, C. Campos-Carraro, S.E. Bianchi, A. Belló-Klein, V. Linck Bassani, A. Sander da Rosa Araujo, Pterostilbene reduces oxidative stress, prevents hypertrophy and preserves systolic function of right ventricle in cor pulmonale model, *Br. J. Pharmacol.* 174 (2017) 3302–3314. doi:10.1111/bph.13948.
- [21] L. Pari, M.A. Satheesh, Effect of pterostilbene on hepatic key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin- and nicotinamide-induced diabetic rats, *Life Sci.* 79 (2006) 641–645. doi:10.1016/j.lfs.2006.02.036.
- [22] M. Lapa, B. Dias, C. Jardim, C.J.C. Fernandes, P.M.M. Dourado, M. Figueiredo, A. Farias, J. Tsutsui, M. Terra-Filho, M. Humbert, R. Souza, Cardiopulmonary manifestations of hepatosplenic schistosomiasis, *Circulation.* 119 (2009) 1518–1523. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.803221.
- [23] S. Das, H.-S. Lin, P.C. Ho, K.-Y. Ng, The Impact of Aqueous Solubility and Dose on the Pharmacokinetic Profiles of Resveratrol, *Pharm. Res.* 25 (2008) 2593–2600. doi:10.1007/s11095-008-9677-1.
- [24] T. Loftsson, M.E. Brewster, Cyclodextrins as functional excipients: Methods to enhance complexation efficiency, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 3019–3032. doi:10.1002/jps.23077.
- [25] J.G. Gomez-Arroyo, L. Farkas, A.A. Alhussaini, D. Farkas, D. Kraskauskas, N.F. Voelkel, H.J. Bogaard, The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective, *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.* 302 (2012) L363–L369. doi:10.1152/ajplung.00212.2011.

- [26] P.M. Werchan, H. McDonough, Right ventricular performance after pulmonary hypertension, *In Vitro*. 130 (1989) 1328–1336. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.010400.
- [27] P. Singal, F. Farahmand, M. Hill, Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale, *Mol Cell Biochem*. 260 (2004) 21–29. <http://dx.doi.org/10.1023/B:MCBI.0000026047.48534.50>.
- [28] P. FLECKNELL, *Laboratory Animal Anaesthesia*, 4th ed., Academic Press, San Diego, 2015.
- [29] UFRGS, *Procedimentos para Anestesia de Animais de Laboratório* –, (2013) 12.
- [30] E. Nozawa, R.M. Kanashiro, N. Murad, A.C.C. Carvalho, S.L.D. Cravo, O. Campos, P.J.F. Tucci, V.A. Moises, Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39 (2006) 687–695. doi:10.1590/S0100-879X2006000500016.
- [31] J.M.D.C. Thiago Boschilia, Rachel Luz Capuano, Marcos Aparecido de Moraes, Jan Johann Reinel de Castro, Ivana Siqueira Mauro, Marcelo Duarte Cortese, Walter Moras Jr, Nathan Herskowitz, Pulmonary vascular resistance in patients with pulmonary hypertension. Use of the oxygen test and evaluation by Doppler echocardiography, *Rev. Bras. Ecocardiografia*. (2007) 22–27.
- [32] J.W. Koskenvuo, R. Mirsky, Y. Zhang, F.S. Angeli, S. Jahn, T.P. Alastalo, N.B. Schiller, A.J. Boyle, K. Chatterjee, T. De Marco, Y. Yeghiazarians, A comparison of echocardiography to invasive measurement in the evaluation of pulmonary arterial hypertension in a rat model, *Int J Cardiovasc Imaging*. 26 (2010) 509–518. doi:10.1007/s10554-010-9596-1.
- [33] R.J. Randall, a Lewis, *The folin by oliver*, *Readings*. 193 (1951) 265–275. doi:10.1016/0304-3894(92)87011-4.
- [34] C.P. LeBel, H. Ischiropoulos, S.C. Bondy, Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress, *Chem. Res. Toxicol.* 5 (1992) 227–231. doi:10.1021/tx00026a012.
- [35] E. Pick, Y. Keisari, A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture., *J. Immunol. Methods*. 38 (1980) 161–170. doi:10.1016/0022-1759(80)90340-3.
- [36] 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. doi:10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x.
- [37] H.B.T.-M. in E. Aebi, [13] Catalase in vitro, in: *Oxyg. Radicals Biol. Syst.*, Academic Press, 1984: pp. 121–126. doi:https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- [38] L. Flohé, W.A.B.T.-M. in E. Günzler, [12] Assays of glutathione peroxidase, in: *Oxyg. Radicals Biol. Syst.*, Academic Press, 1984: pp. 114–120. doi:https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05015-1.
- [39] J.A. Buege, S.D. Aust, [30] Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol.* 52 (1978) 302–310. doi:10.1016/S0076-6879(78)52032-6.

- [40] B. Gonzalez Flecha, S. Llesuy, A. Bovf-~s, HYDROPEROXIDE-INITIATED CHEMILUMINESCENCE: AN ASSAY FOR OXIDATIVE STRESS IN BIOPSIES OF HEART, LIVER, AND MUSCLE, *Free Radic. Biol. Med.* 10 (1991) 93–100. https://ac.els-cdn.com/089158499190002K/1-s2.0-089158499190002K-main.pdf?_tid=8f2024b1-fba9-469a-8550-f1ea59995836&acdnat=1522331990_fe50c7c8ea648168e86ec8f1c2649e66 (accessed March 29, 2018).
- [41] D.L. Granger, N.M. Anstey, W.C. Miller, J.B.B.T.-M. in E. Weinberg, [6] Measuring nitric oxide production in human clinical studies, in: *Nitric Oxide Part C Biol. Antioxid. Act.*, Academic Press, 1999: pp. 49–61. doi:[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)01068-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)01068-X).
- [42] M.Y. Aksenov, W.R. Markesbery, Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer’s disease, (n.d.). https://ac.els-cdn.com/S0304394001016366/1-s2.0-S0304394001016366-main.pdf?_tid=59e3497f-91cf-47f5-9af6-2719f311365d&acdnat=1522332373_f5662438e1c2b8b2753fb673eb75f14e (accessed March 29, 2018).
- [43] J.J. Ryan, G. Marsboom, S.L. Archer, Rodent Models of Group 1 Pulmonary Hypertension BT - Pharmacotherapy of Pulmonary Hypertension, in: M. Humbert, O. V Evgenov, J.-P. Stasch (Eds.), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013: pp. 105–149. doi:10.1007/978-3-642-38664-0_5.
- [44] R.M. Tuder, N.F. Voelkel, Pulmonary hypertension and inflammation, (n.d.).
- [45] M. Humbert, O. Sitbon, A. Chaouat, M. Bertocchi, G. Habib, V. Gressin, A. Yaici, E. Weitzenblum, J.F. Cordier, F. Chabot, C. Dromer, C. Pison, M. Reynaud-Gaubert, A. Haloun, M. Laurent, E. Hachulla, G. Simonneau, Pulmonary arterial hypertension in France: Results from a national registry, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173 (2006) 1023–1030. doi:10.1164/rccm.200510-1668OC.
- [46] N.F. Voelkel, J. Gomez-Arroyo, A. Abbate, H.J. Bogaard, M.R. Nicolls, Pathobiology of pulmonary arterial hypertension and right ventricular failure, *Eur. Respir. J.* 40 (2014) 1555–1565. doi:10.1183/09031936.00046612.Pathobiology.
- [47] N.F. Cerqueira, W.B. Yoshida, Óxido Nítrico: Revisão, *Acta Cir. Bras.* 17 (2002) 417–423. doi:10.1590/S0102-86502002000600011.
- [48] A. Kowalczyk, P. Kleniewska, M. Kolodziejczyk, B. Skibska, A. Goraca, The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 63 (2015) 41–52. doi:10.1007/s00005-014-0310-1.
- [49] C.F. Ng, F.Q. Schafer, G.R. Buettner, V.G.J. Rodgers, The rate of cellular hydrogen peroxide removal shows dependency on GSH: Mathematical insight into in vivo H₂O₂ and GPx concentrations, *Free Radic. Res.* 41 (2007) 1201–1211. doi:10.1080/10715760701625075.
- [50] E. Birben, U.M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, O. Kalayci, Oxidative Stress and Antioxidant Defense, (2012) 9–19.
- [51] A. Ayala, M.F. Muñoz, S. Argüelles, Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014 (2014). doi:10.1155/2014/360438.
- [52] H. Sies, Oxidative stress: oxidants and antioxidants, *Exp. Physiol.* 82 (1997) 291–295. doi:10.1113/expphysiol.1997.sp004024.

- [53] N.R. Perron, J.L. Brumaghim, A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding, *Cell Biochem. Biophys.* 53 (2009) 75–100. doi:10.1007/s12013-009-9043-x.
- [54] J.A. Ross, C.M. Kasum, DIETARY FLAVONOIDS: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety, *Annu. Rev. Nutr.* 22 (2002) 19–34. doi:10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957.
- [55] R. Rodrigo, A. Miranda, L. Vergara, Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease, *Clin. Chim. Acta.* 412 (2011) 410–424. doi:10.1016/j.cca.2010.11.034.

LEGENDA DAS FIGURAS

FIGURA 1.

Parâmetros de Resistência Vascular pulmonar (A) e Razão entre Tempo de Aceleração por Tempo de Ejeção (B), obtidos durante a ecografia, 21 dias após indução da HAP, para os diferentes grupos experimentais. Valores expressos como média \pm desvio padrão de 6-8 animais por grupo. a significativamente diferente do grupo CTR ($P < 0.05$); b significativamente diferente do grupo HAP ($P < 0.05$). RVP: resistência vascular pulmonar; mPAP: pressão média da artéria pulmonar; TAC/TEJ: tempo de aceleração/tempo de ejeção pela artéria pulmonar; CTR: grupo controle; HAP: grupo doente; HAP+PTS: grupo doente tratado com PTS:HP β CD.

FIGURA 2.

Parâmetros de Pressão Arterial Pulmonar média, obtidos durante a ecografia, 21 dias após indução da HAP, para os diferentes grupos experimentais. Valores expressos como média \pm desvio padrão de 6-8 animais por grupo. a significativamente diferente do grupo CTR ($P < 0.05$); b significativamente diferente do grupo HAP ($P < 0.05$). mPAP: pressão média da artéria pulmonar; CTR: grupo controle; HAP: grupo doente; HAP+PTS: grupo doente tratado com PTS:HP β CD.

FIGURA 3.

Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio Totais (A), Peróxido de Hidrogênio (B), Lipoperoxidação por teste de quimiluminescência (C), Lipoperoxidação por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS (D) e NADPH Oxidase (E) em tecido pulmonar, 21 dias após indução da HAP, para os diferentes grupos experimentais. Valores expressos como média \pm desvio padrão de 6-8 animais por grupo. a significativamente diferente do grupo CTR ($P < 0.05$); b significativamente diferente do grupo HAP ($P < 0.05$). CTR: grupo controle; HAP: grupo doente; HAP+PTS: grupo doente tratado com PTS:HP β CD.

FIGURA 4.

Atividade das enzimas Superóxido dismutase (SOD) (A), Catalase (CAT) (B) e Glutathiona peroxidase (GPx) (C), no tecido pulmonar, 21 dias após indução da HAP. Valores expressos como média \pm desvio padrão de 6-8 animais por grupo. a significativamente diferente

do grupo CTR ($P < 0.05$); b significativamente diferente do grupo HAP ($P < 0.05$). CTR: grupo controle; HAP: grupo doente; HAP+PTS: grupo doente tratado com PTS:HP β CD.

FIGURA 5.

Níveis de grupamentos sulfidrilas (A), e quantidade de nitritos totais (B), em tecido pulmonar, 21 dias após indução da HAP, para os diferentes grupos experimentais. Valores expressos como média \pm desvio padrão de 6-8 animais por grupo. a significativamente diferente do grupo CTR ($P < 0.05$); b significativamente diferente do grupo HAP ($P < 0.05$). CTR: grupo controle; HAP: grupo doente; HAP+PTS: grupo doente tratado com PTS:HP β CD.

FIGURA 1.

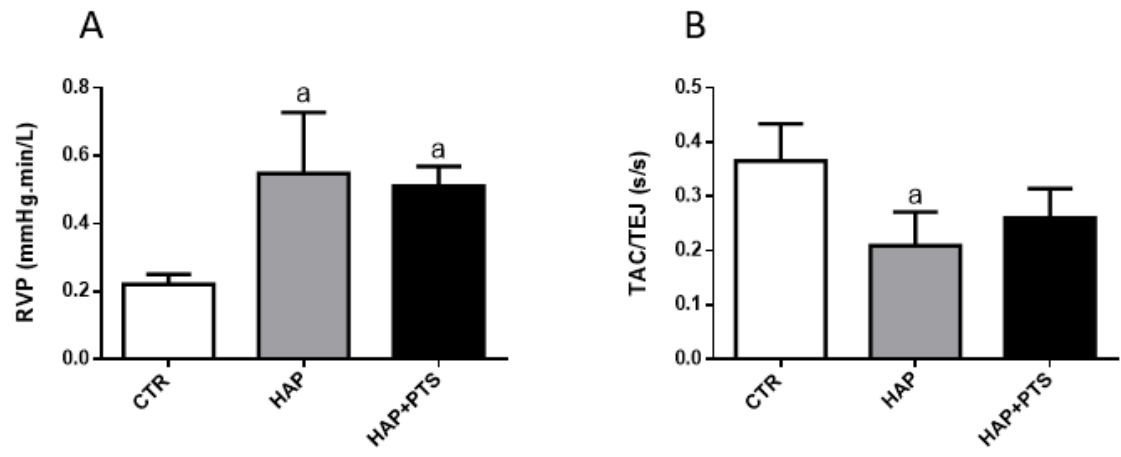


FIGURA 2.

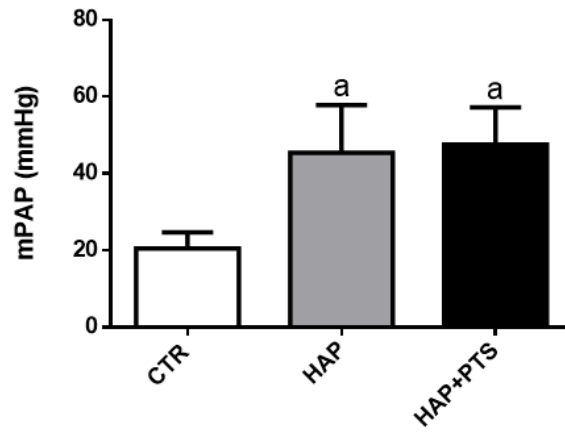


FIGURA 3.

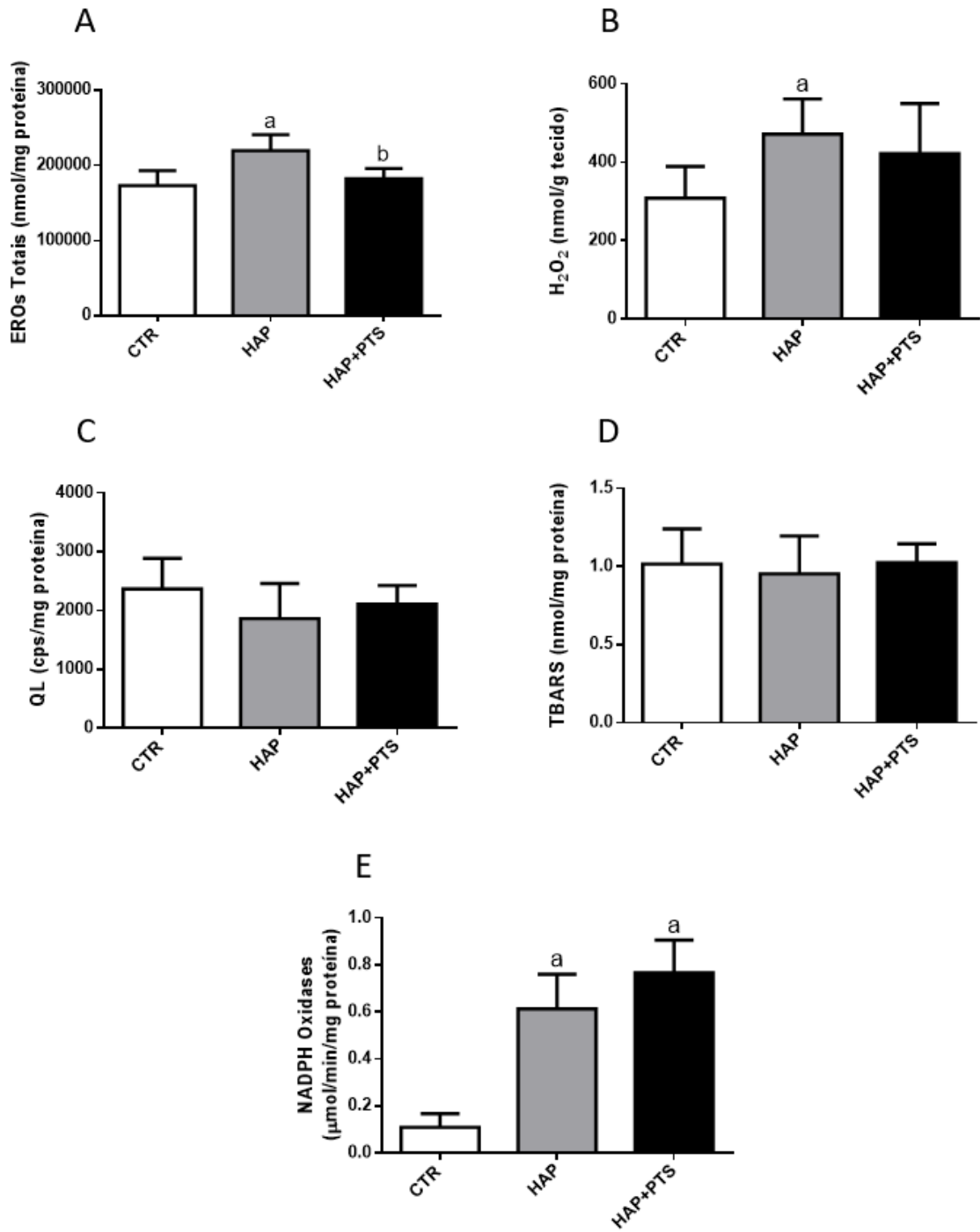


FIGURA 4.

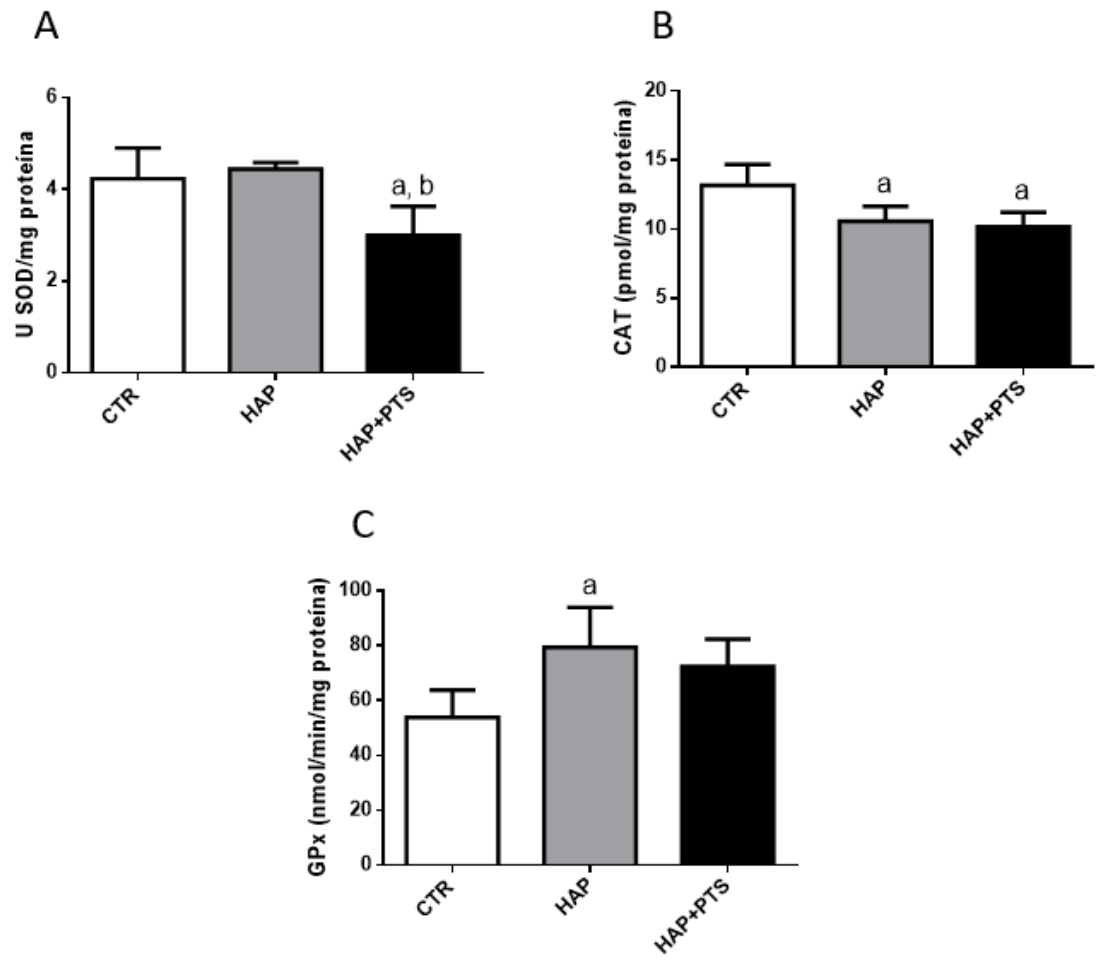
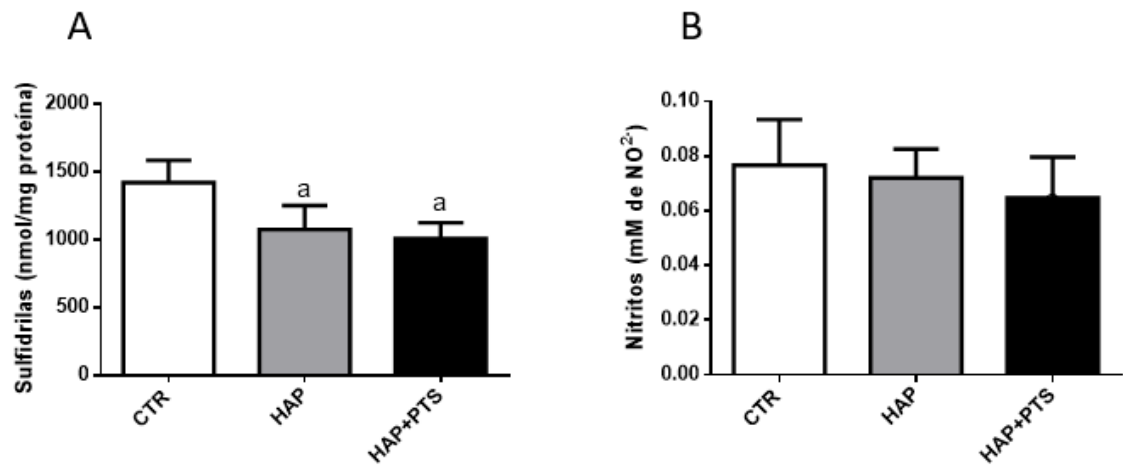


FIGURA 5.



5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foi possível observar alterações funcionais e bioquímicas, através da resistência pulmonar e estresse oxidativo em pulmão. O fitoquímico pterostilbeno complexado a hidroxipropil- β -ciclodextrina (PTS:HP β CD) foi capaz de reverter parcialmente o fluxo sanguíneo pela artéria pulmonar, sem promover influência sobre a RVP e a mPAP nos animais. Quanto à sua ação antioxidante, obtivemos redução de EROs, parâmetro que foi revertido pelo tratamento com pterostilbeno, igualando a níveis normais de controle. A monocrotalina levou ao aumento de NADPH Oxidases, parâmetro que não sofreu alteração após administração do PTS:HP β CD. Acerca da atividade de enzimas antioxidantes, os animais doentes apresentaram igual atividade da SOD e maior atividade da GPx, além de uma diminuição na atividade da CAT. O tratamento com PTS modulou a atividade enzimática. Houve alteração na atividade da GPx que diretamente influenciou a diminuição de H₂O₂. Tanto a monocrotalina quanto o PTS:HP β CD não promoveram alteração nos níveis de lipoperoxidação.

Para concluir, é importante salientar a contribuição deste estudo para ciência, uma vez que não há outros trabalhos que investiguem os efeitos do PTS na HAP, a fim de elucidar o impacto deste tratamento sobre o tecido pulmonar. De fato, podemos concluir que este tratamento tenha se mostrado benéfico no pulmão, podendo contribuir para a manutenção da função cardíaca direita. Entretanto, mais estudos são necessários para averiguar o impacto da administração do PTS sobre outros mecanismos antioxidantes, potencial vasodilatador, bem como vias inflamatórias e de sobrevivência celular no tecido pulmonar.

Assim, fica como perspectiva deste trabalho realizar outras medidas de estresse oxidativo e nitrosativo (espécies reativas de nitrogênio), como análises da via da enzima óxido nítrico sintase. Além disso, analisar a expressão e a atividade de outras enzimas antioxidantes e vias de sinalização redox, como as enzimas glutarredoxina, tiorredoxina, e a enzima cinase regulada por sinal extracelular como a proteína cinase B (AKT/PKB). Por fim, uma ideia interessante seria também a realização de uma metanálise, para integrar os resultados pulmonares e cardíacos obtidos, o que contribuiria para uma intervenção precisa e comprometida com a patologia da HAP.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, J. D.; GHASKADBI, S. S. Protective effect of Pterostilbene against free radical mediated oxidative damage. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 238, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3849269/>>. Acesso em: 20 maio 2018.
- AFANAS'EV, I. ROS and RNS signaling in heart disorders: Could antioxidant treatment be successful? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2011, 293769, 2011.
- ALSHIKH, N. et al. Phenolics of selected lentil cultivars : Antioxidant activities and inhibition of low-density lipoprotein and DNA damage. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 1022–1038, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.018>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- ANTONIO, J. P. et al. Determination of stoichiometric coefficients and apparent formation constants for cyclodextrin complexes of trans -resveratrol using reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1135, p. 158–165, 2006.
- ARDINI, M. N. et al. Absorption of Phenolic Acids in Humans after Coffee Consumption. **Agricultural and food chemistry**, p. 5735–5741, 2002.
- BENZA, R. L. et al. Predicting survival in pulmonary arterial hypertension: Insights from the registry to evaluate early and long-term pulmonary arterial hypertension disease management (REVEAL). **Circulation**, v. 122, n. 2, p. 164–172, 2010.
- BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.
- BOGAARD, H. J. et al. The right ventricle under pressure. **Chest**, v. 135, n. 3, p. 794–804, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1378/chest.08-0492>> Acesso em: 5 mar. 2018.
- BRAVO, L. Polyphenols : Chemistry , dietary sources , metabolism , and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, 1998.
- BRITO, R. et al. Oxidative Stress in Hypertension : Mechanisms and Therapeutic Opportunities. **Experimental and Clinical Endocrinol Diabetes**, v. 123, n. 6, p. 325–335, 2015.
- CHEMICAL, P. Review article polyphenols of pterocarpus woods, v. 11, n. April 1971, 1972.
- CHEN, S. J. et al. Endothelin-receptor antagonist bosentan prevents and reverses hypoxic pulmonary hypertension in rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 79, n. 6, p. 2122–31, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8847282>>. Acesso em: 9 mar. 2018.
- CHEYNIER, V. et al. Plant Physiology and Biochemistry Plant phenolics : Recent advances on their biosynthesis , genetics , and ecophysiology. **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 72, p. 1–20, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>>. Acesso

em: 22 maio 2018.

CHIN, K. M.; RUBIN, L. J. Pulmonary Arterial Hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 51, n. 16, p. 1527–1538, 2008.

CHOO, Q. Y. et al. Pterostilbene surpassed resveratrol for anti-inflammatory application: Potency consideration and pharmacokinetics perspective. **Journal of Functional Foods**, v. 11, n. C, p. 352–362, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.018>>. Acesso em: 5 abr. 2018.

CHOPRA, S. et al. Pulmonary arterial hypertension: Advances in pathophysiology and management. **Indian Journal of Pharmacology**, India, v. 44, n. 1, p. 4–11, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3271537/>>. Acesso em: 9 mar. 2018.

COOL, C. D. et al. Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. Evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth. **The American journal of pathology**, v. 155, n. 2, p. 411–9, 1999. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1866857&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 9 mar. 2018.

CORBIN, J. D. et al. High lung PDE5: A strong basis for treating pulmonary hypertension with PDE5 inhibitors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 334, n. 3, p. 930–938, 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X05014324?via%3Dihub>>. Acesso em: 9 mar. 2018.

CRINI, G. Review: A History of Cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 21, p. 10940–10975, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/cr500081p>>. Acesso em: 2 maio 2018.

CROSSWHITE, P.; SUN, Z. Nitric oxide, oxidative stress and inflammation in pulmonary arterial hypertension. **Journal of hypertension**, v. 28, n. 2, p. 201–12, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20051913>>. Acesso em: 9 mar. 2018.

DAHAL, B. K. et al. Involvement of mast cells in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **Respiratory Research**, v. 12, n. 1, p. 60, 2011. Disponível em: <<http://respiratory-research.com/content/12/1/60>>. Acesso em: 9 mar. 2018.

DELBIN, M. A.; ANTUNES, E.; ZANESCO, A. Role of exercise training on pulmonary ischemia/reperfusion and inflammatory response. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 24, n. 4, p. 552–561, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-76382009000500017>. Acesso em: 21 abr. 2018.

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

DINH, Q. N. et al. Roles of Inflammation, Oxidative Stress, and Vascular Dysfunction in Hypertension. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2014, p. 406960, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4124649/>>. Acesso em: 11

mar. 2018.

DAS K; MAULIK. **Molecular intervention**. Cardiovascular Research Center, University of Connecticut School of Medicine, v. 6. p. 36–47.

LACERDA, D. S. et al. Pterostilbene reduces oxidative stress, prevents hypertrophy and preserves systolic function of right ventricle in cor pulmonale model. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 19, p. 3302–3314, 2017.

DUTHIE, G.; CROZIER, A. Plant-derived phenolic antioxidants. **Current Opinion in Clinical Nutrition Metabolic Care**, v. 3, n. 6, p. 43–47, 2000.

FRIDOVICH, I. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 97–112, 1995. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525>>. Acesso em: 21 abr. 2018.

GOLDAMAN, L. **Goldman - Cecil Medicina**. 24^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

GOMEZ-ARROYO, J. et al. A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: problems and prospects. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, Bethesda, v. 302, n. 10, p. L977–L991, 2012. a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3774477/>>. Acesso em: 11 mar. 2018.

GOMEZ-ARROYO, J. G. et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. **AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 302, n. 4, p. L363–L369, 2012. b. Disponível em: <<http://ajplung.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajplung.00212.2011>>. Acesso em: Acesso em: 11 mar. 2018.

HABIB, G.; TORBICKI, A. The role of echocardiography in the diagnosis and management of patients with pulmonary hypertension. **European Respiratory Review**, v. 19, n. 118, p. 288–299, 2010.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312–322, 2006. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.106.077073>>. Acesso em: 21 abr. 2018.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. Oxford: Clarendon Press, 2015.

HOEPER, M. M. et al. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 25 Suppl., p. D42–D50, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2013.10.032>>. Acesso em: 11 mar. 2018.

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**, v. 184, n. 10, p. 1114–1124, 2011.

HUMBERT, M. et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 43, n. 12 Suppl., p. S13–

S24, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2004.02.029>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

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

HUMBERT, M. et al. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. **Circulation**, v. 122, n. 2, p. 156–163, 2010.

JAMES, W.; ANNA, H. **Experimental and Transgenic Models of Pulmonary Hypertension**, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/cphy.c100003>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

JASMIN, J. F. et al. Effectiveness of a nonselective ET(A/B) and a selective ET(A) antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 103, n. 2, p. 314–318, 2001.

KA, M. P. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954–3962, 1999.

KEHRER, J. P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, n. 1, p. 43–50, 2000.

KFOURY, M.; LANDY, D.; FOURMENTIN, S. **Characterization of Cyclodextrin/Volatile Inclusion Complexes: A Review**, 2018.

KIELY, D. G. et al. Pulmonary hypertension: diagnosis and management. **BMJ : British Medical Journal**, v. 346, 2013. Disponível em: <<http://www.bmj.com/content/346/bmj.f2028.abstract>> Acesso em: 14 mar. 2018.

KIM, D.; WEON, S.; LEE, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, v. 81, n. 3, v. 81, p. 321–326, 2003.

KJUN KAWABATA, MANABU MISHIMA, H. K. and J. M. Kobophenol b, a tetrastilbene from carex pumila. **Phytochemistry**, v. 30, n. 2, v. 30, n. 2, p. 12–14, 1991.

KOPPENOL, W. H. The Centennial of the Fennton Reaction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 15, p. 645–651, 1993.

KOSURU, R.; SINGH, S. Pterostilbene ameliorates insulin sensitivity, glycemic control and oxidative stress in fructose-fed diabetic rats. **Life Sciences**, v. 182, p. 112–121, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2017.06.015>> Acesso em: 18 maio 2018.

KYAW, M. et al. Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 8, p. 977–85, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15301727>> Acesso em: 2 maio 2018.

LAI, Y.-C. et al. Pulmonary Arterial Hypertension: The Clinical Syndrome. **Circulation**

- Research**, v. 115, n. 1, p. 115–130, 2014. Disponível em: <<http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCRESAHA.115.301146>> Acesso em: 14 mar. 2018.
- LANGCAKE, P.; PRYCE, R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. **Physiological Plant Pathology**, v. 9, n. 1, p. 77–86, 1976.
- LAPA, M. et al. Cardiopulmonary manifestations of hepatosplenic schistosomiasis. **Circulation**, v. 119, n. 11, p. 1518–1523, 2009.
- LIN, H.; YUE, B.; HO, P. C. Determination of pterostilbene in rat plasma by a simple HPLC-UV method and its application in pre-clinical pharmacokinetic. **Biomedical Chromatography**, v. 26, n. 12, p. 1308–1315, 2009.
- LOFTSSON, T. **Cyclodextrins**. 2002, p. 213-218.
- LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>> Acesso em: 14 abr. 2018.
- LV, M. I. N. et al. Pterostilbene attenuates the inflammatory reaction induced by ischemia / reperfusion in rat heart. **Molecular Medicine Reports** n. 85, p. 724–728, 2015.
- MAARMAN, G. et al. A comprehensive review : the evolution of animal models in pulmonary hypertension research ; are we there yet ? **Pulmonary Circulation**, v. 3, n. 4, p. 739–756, 2014.
- MACCARTHY, P. A.; SHAH, A. M. Oxidative stress and heart failure. **Coronary Artery Disease**, v. 14, n. 2, 2003. Disponível em: <https://journals.lww.com/coronary-artery/Fulltext/2003/04000/Oxidative_stress_and_heart_failure.3.aspx> Acesso em: 14 abr. 2018.
- MALENFANT, S. et al. Signal transduction in the development of pulmonary arterial hypertension. **Pulmonary Circulation**, v. 3, n. 2, p. 278–293, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24015329> Acesso em: 16 mar. 2018.
- MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, 1 May 2004, p. 727–747,
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: An Enzymic Function For Erythrocuprein (Hemocuprein) . **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049–6055, 1969. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/244/22/6049.abstract>> Acesso em: 8 maio 2018.
- MCGOON, M. D. et al. Pulmonary arterial hypertension: Epidemiology and registries. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 25 suppl., 2013.
- MCLAUGHLIN, V. V. et al. Management of pulmonary arterial hypertension. **Journal of the**

American College of Cardiology, v. 65, n. 18, p. 1976–1997, 2015.

MILLER, A. F. Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. **FEBS Letters**, v. 586, n. 5, p. 585–595, 2012.

MOCUMBI, A. O.; THIENEMANN, F.; SLIWA, K. A Global Perspective on the Epidemiology of Pulmonary Hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 31, n. 4, p. 375–381, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cjca.2015.01.030>> Acesso em: 5 mar. 2018.

MONTANI, D. et al. Targeted therapies in pulmonary arterial hypertension. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 141, n. 2, p. 172–191, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725813002076?via%3Dihub>>. Acesso em: 21 abr. 2018.

MULAKAYALA, C. et al. Synthesis and evaluation of resveratrol derivatives as new chemical entities for cancer. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 41, p. 43–54, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1093326313000181>> Acesso em: 8 maio 2018.

NG, C. F. et al. The rate of cellular hydrogen peroxide removal shows dependency on GSH: Mathematical insight into in vivo H₂O₂ and GPx concentrations. **Free Radical Research**, v. 41, n. 11, p. 1201–1211, 2007.

NOGUEIRA-FERREIRA, R. et al. Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 35, p. 8–16, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pupt.2015.09.007>> Acesso em: 22 mar. 2018.

OGAWA, A.; EJIRI, K.; MATSUBARA, H. Long-term patient survival with idiopathic/heritable pulmonary arterial hypertension treated at a single center in Japan. **Life Sciences**, v. 118, n. 2, p. 414–419, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.01.077>> Acesso em: 10 mar. 2018.

PEACOCK, A. J. et al. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. **European Respiratory Journal**, v. 30, n. 1, p. 104–109, 2007. Disponível em: <<http://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.00092306>> Acesso em: 10 maio 2018.

PEREČKO, T. et al. Structure-efficiency relationship in derivatives of stilbene . Comparison of resveratrol , pinosylvin and pterostilbene. **Neuro Endocrinol Lett.** v. 29, n. 5, p. 802–805, 2008.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11–26, 2015.

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

POLONIO, I. B. et al. Original Article. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38, n. May, p. 452–460, 2012.

RICHE, D. M. et al. Analysis of Safety from a Human Clinical Trial with Pterostilbene. **Journal of Toxicology**, v. 2013, p. 463595, 2013. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3575612/>> Acesso em: 5 mar. 2018.

RIMANDO, A. M. et al. Cancer Chemopreventive and Antioxidant Activities of Pterostilbene, a Naturally Occurring Analogue of Resveratrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3453–3457, 2002. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1021/jf0116855>> Acesso em: 5 abr. 2018.

RIMANDO, A. M. et al. Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in Vaccinium berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4713–4719, 2004.

RYAN, J. J.; MARSBOOM, G.; ARCHER, S. L. Rodent Models of Group 1 Pulmonary Hypertension BT - Pharmacotherapy of Pulmonary Hypertension. In: HUMBERT, M.; EVGENOV, O. V; STASCH, J.-P. (Eds.). **Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 105–149.

SAMJOO, I. A. et al. The effect of endurance exercise on both skeletal muscle and systemic oxidative stress in previously sedentary obese men. **Nutrition and Diabetes**, v. 3, n. SEPTEMBER, p. e88-10, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nutd.2013.30>>

Acesso em: 14 abr. 2018.

SAOKHAM, P. et al. Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. **Molecules**. v. 23, p. 1161 2018.

SAVAI, R. et al. Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 186, n. 9, p. 897–908, 2012.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of Nutrition**. v. 130 p. 2073-2085

SCHERMULY, R. T. et al. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. **Nature Reviews Cardiology**, v. 8, p. 443, 2011. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2011.87>> Acesso em: 16 mar. 2018.

SCHOENTAL, R.; HEAD, M. A. Pathological changes in rats as a result of treatment with monocrotaline. **British Journal of Cancer**, v. 9, n. 1, p. 229–237, 1955.

SHUJAAT, A.; MINKIN, R.; EDEN, E. Pulmonary hypertension and chronic cor pulmonale in COPD. **International journal of chronic obstructive pulmonary disease**, v. 2, n. 3, p. 273–82, 2007. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2695205&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>> Acesso em: 20 maio 2018.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291–295, 1997. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>>. Acesso em: 21 mar. 2018.

SIMONNEAU, G. et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 25 suppl., 2013.

SINGAL, P. K. et al. Oxidative Stress Status in the Transition of Hypertrophy to Heart Failure. **Heart Failure Reviews**, v. 4, n. 4, p. 353–360, 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1023/A:1009803703243>> Acesso em: 14 abr. 2018.

SIREROL, J. A. et al. Free Radical Biology and Medicine Topical treatment with pterostilbene, a natural phytoalexin, effectively protects hairless mice against UVB radiation-induced skin damage and carcinogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 85, p. 1–11, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.027>> Acesso em: 2 abr. 2018.

SITI, H. N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAN, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 40–56, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2015.03.005>> Acesso em: 16 mar. 2018.

SONG, L. T. et al. Study On Inclusion Interaction Of Ibuprofen With B - Cyclodextrin Derivatives. **Latin American applied research** v. 151, p. 147–151, 2011.

STENMARK, K. R. et al. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. **AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 297, n. 6, p. L1013–L1032, 2009. Disponível em: <<http://ajplung.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajplung.00217.2009>> Acesso em: 15 abr. 2018.

TABIMA, D. M.; FRIZZELL, S.; GLADWIN, M. T. Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. **Free Radical Biology and Medicine** v. 52 p. 1970-1986. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584912001451>> Acesso em: 20 maio 2018.

TRACHOOTHAM, D. et al. Redox Regulation of Cell Survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 8, p. 1343–1374, 2008. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ars.2007.1957>>. Acesso em: 10 maio 2018.

TSAI, H.; HO, C.; CHEN, Y. Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 1, p. 134–147, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.004>> Acesso em: 7 abr. 2018.

TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; MATSUSHIMA, S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodeling. **Cardiovascular Research**, v. 81, n. 3, p. 449–456, 2009.

TUDER, R. M. et al. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. **American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine**, v. 159, n. 6, p. 1925–1932, 1999.

TUDER, R. M. et al. Development and Pathology of Pulmonary Hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, n. 1 SUPPL. 1, p. S3–S9, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2009.04.009>> Acesso em: 20 maio 2018.

WANG, B. et al. Neuroprotective effects of pterostilbene against oxidative stress injury : Involvement of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway. **Brain Research**, v. 1643, p. 70–79, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.048>> Acesso em: 19 abr. 2018.

WU, M. et al. Protective Effects of Pterostilbene Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. **Inflammation**, v. 40, n. 2, p. 578–588, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10753-016-0504-2>> Acesso em: 6 abr. 2018.

WULF, D. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, v. 88, p. 47–95, 2002.

YAMADA, M. et al. Stilbenoids of *Kobresia nepalensis* (Cyperaceae) exhibiting DNA topoisomerase II inhibition. **Phytochemistry**, v. 67, p. 307–313, 2006.

YAO et al. Pterostilbene and 4-Methoxyresveratrol Inhibited Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response in RAW264.7 Macrophages. **Molecules**, v. 4, p. 1148, 2018.

YEO, S. C. M.; HO, P. C.; LIN, H. S. Pharmacokinetics of pterostilbene in Sprague-Dawley rats: The impacts of aqueous solubility, fasting, dose escalation, and dosing route on bioavailability. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, n. 6, p. 1015–1025, 2013.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 1, p. 139–162, 1994. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.1.139>> Acesso em: 20 maio 2018.

ZHU, X. et al. Activation of Sirt1 by Resveratrol Inhibits TNF- α Induced Inflammation in Fibroblasts. **PLoS ONE**, San Francisco, USA, v. 6, n. 11, p. e27081, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3206084/>> Acesso em: 5 mar. 2018.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA *BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY*

GUIDE FOR AUTHORS

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).



Before You Begin

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of

authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of existing agreements are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the accepted manuscript in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The published journal article cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more.](#)

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.evise.com/profile/api/navigate/BIOPHA>

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.



Preparation

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions are typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents

of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Illustration services

Elsevier's WebShop offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References***Citation in text***

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes.](#)

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/biomedicine-and-pharmacotherapy>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Western blots images

Biomedicine & Pharmacotherapy requires submission of the whole uncropped images of the original western blots in triplicate that contributed to the quantitative analysis, from which figures have been derived. Please submit as Supplementary Figure(s). **Please note that this is mandatory when western blots are shown.**

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is

directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data page](#).

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the

opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).



After Acceptance

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.



Author Inquiries

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).