

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
LABORATÓRIO DE FISILOGIA CARDIOVASCULAR**

**MODULAÇÃO DA HIPERTENSÃO PULMONAR INDUZIDA POR
MONOCROTALINA ATRAVÉS DA ADMINISTRAÇÃO DE
SUCO DE UVA E VINHO TINTO**

GILBERTI HELENA HÜBSCHER

Orientador: Prof^a. Dra. ADRIANE BELLÓ KLEIN

Co-orientador: Prof^a. Dra. SUSANA LLESUY

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de
concentração: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas - Fisiologia**

Porto Alegre, agosto de 2005.

*Dedico este trabalho
com especial amor e carinho a filha
Laiza.*

AGRADECIMENTO

A Deus, pela certeza que todo esforço vale a pena, pelo amparo e consolo, e pelo caminho de luz que sempre me guiou.

A minha filha Laiza, meu presente de Deus, razão e motivo de caminhar.

A meu esposo pelo constante apoio recebido, que estava sempre a meu lado.

Aos meus Pais e irmãos, pelo incentivo e apoio constante à busca do crescimento e realização pessoal, que muito estiveram ao meu lado.

A minha orientadora, Prof.^a Dra. Adriane Belló Klein pelo apoio e ajuda constante, dedicação, pela destreza e orientações seguras recebidas para esta formação.

A meu co-orientador Prof.^a Dra. Susana Llessuy pelo apoio constante, dedicação incansável, orientação e destreza segura recebida por esta formação.

A Rita de Cassia Nunes pelo apoio e dedicação incansável em todos os momentos dos quais muitos me facilitaram a caminhada.

A Prof. Dra. Erna Jong Vogt, pelo exemplo de vida, por seu apoio em muitos momentos.

Aos bolsistas pela sua dedicação: Ana Carolina, Cassiana, Felipe, Jorge, Marcos, Nicole, Paulo. A Tânia Regina Gatelli pela constante ajuda na parte experimental. A Jaqueline Barp pelo apoio recebido na execução de técnicas.

Ao grande Mestre Prof. Dr. Antonio Andrea Belló, pela sua riqueza como *Ser*, com certeza continua-nos inspirando.

Ao departamento de Fisiologia, pela oportunidade de crescimento profissional.

A meus colegas de Trabalho da Feevale, pelo apoio recebido.

A Dna. Zina que sempre me apoiou e se prontificou a facilitar o caminho. A Dra. Ana Mery que me mostrou muitos caminhos.

A Marines Malechi, uma grande pessoa que se prontificou em me auxiliar na análise dos produtos. A Ionara Magalhães que me auxiliou na técnica.

A Juciane da Casa Valduga, que sempre soube me acolher.

A Casa Valduga e Casa de Madeira por apoiarem este trabalho.

Aos meus pacientes que me ensinaram que sua dor era maior que a minha, razão de buscar conhecimento.

Agradeço a todos que passaram por mim que de uma forma ou outra deixaram sua lembrança. Neste período aprendi, que as palavras não devem ser demasiadamente valorizadas.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
RESUMO	17
ABSTRACT	19
1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Epidemiologia	21
1.2 Patogênese da Insuficiência Cardíaca	23
1.3 Modelo de Insuficiência Cardíaca por Monocrotalina	26
1.4 Hipertensão Pulmonar	28
1.5 Estresse Oxidativo	33
1.6 Efeitos Biológicos dos Radicais Livres	33
1.7 Sistemas de Defesa Antioxidante	36
1.7.1 Antioxidantes Enzimáticos	37
1.7.2 Antioxidante Não Enzimáticos.....	39
1.8 Poder Antioxidante dos Polifenóis	40
1.9 Os Polifenóis da Uva em Doenças Cardiovasculares e Hipertensão Pulmonar	41
1.10 Hipótese.....	45
1.11 Objetivo.....	45
1.11.1 Objetivo Geral.....	45

1.11.2 Objetivos Específicos	45
2. MATERIAIS E METODOS	47
I. Análises <i>in vitro</i>	47
2.1 Screening Fitoquímico Qualitativo	47
2.1.1 Ensaio de catequinas	47
2.1.2 Ensaio de Resinas	48
2.1.3 Ensaio de Fehling	48
2.1.4 Ensaio de Baljet	48
2.1.5 Ensaio de Lieberman-Burchard	49
2.1.6 Ensaio de Espuma	49
2.1.7 Ensaio Cloreto Férrico	49
2.1.8 Ensaio de Borntraeger	50
2.1.9 Ensaio de Shinoda	50
2.1.10 Ensaio de Kedde	51
2.1.11 Ensaio de alcalóides	51
2.1.11.1 Ensaio de Dragendorff	51
2.1.11.2 Ensaio de Mayer	51
2.1.12 Testes específicos para Flavonóides	52
2.1.12.1 Reação da cionidina ou Shinoda	52
2.1.12.1.1 Reação oxalo-bórica	52
2.1.12.1.2 Reação com os hidróxidos alcalinos	52
2.1.12.1.3 Reação com o Cloreto Férrico	52
2.2 Capacidade Antioxidante Total (TRAP) <i>in vitro</i>	53
2.3 Reatividade Antioxidante Total (TAR) <i>in vitro</i>	54
2.4 Ensaio para Determinação da Xantina Oxidase (XO)	54
II. Análise <i>in Vivo</i>	55
2.5 Animais	55
2.6 Grupos Experimentais	55
2.8 Protocolo Experimental	56
2.8 Avaliação do Crescimento e demais Parâmetros Nutricionais	58
2.9 Indução de Insuficiência Cardíaca	58

2.10 Aparência Geral e Mortalidade dos Animais	58
2.11 Nível de Congestão Hepática e Pulmonar	59
2.12 Hipertrofia Cardíaca, Ventricular Direita e Esquerda	59
2.13 Avaliação Hemodinâmica	60
2.14 Morte dos Animais e Preparo dos Homogeneizados	60
2.15 Quantificação de Proteína	61
2.16 MEDIDAS DE ESTRESSE OXIDATIVO	62
2.16.1 MEDIDAS DE LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO)	62
2.16.1.1 Quimiluminescência Iniciada por t-BOOH	62
2.16.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	63
2.16.2.1 Superóxido Dismutase (SOD)	63
2.16.2.2 Catalase (CAT)	64
2.16.2.3 Glutathiona Peroxidase (GPx)	65
2.16.3 Medida da Capacidade Antioxidante Total (TRAP)	66
2.17 Determinação de Nitritos e Nitratos	67
2.18 Análise Estatística	68
3. RESULTADOS	69
I. Experimentos <i>in Vitro</i>	69
3.1 Análise de Compostos Fitoquímicos Presentes no Vinho e Suco	69
3.2 Medida da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) no Vinho	71
3.3 Medida da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) no Suco de Uva	72
3.4 Medida da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) no vinho e no suco de Uva	73
3.5 Medida da Reatividade Antioxidante Total (TAR) do vinho e do suco de uva	74
3.6 Xantina Oxidase	75
II. Experimentos <i>in Vivo</i>	76
3.7 Avaliação Subjetiva Global e Mortalidade	76
3.8 Ganho de Peso dos Animais	77
3.9 Consumo Alimentar nos Distintos Grupos.....	78

3.10	Análise da Congestão de Órgãos	59
3.11	Análise de Parâmetros Morfométricos	80
3.12	Medidas Hemodinâmicas	82
3.13	Medidas de Estresse Oxidativo	84
3.13.1	Medidas de Lipoperoxidação por Quimiluminescência (QL)	84
3.13.2	Análise das Enzimas Antioxidantes	86
3.13.2.1	Enzima Superóxido Dismutase (SOD)	86
3.13.2.2	Enzima Catalase (CAT)	88
3.13.2.3	Enzima Glutationa Peroxidase (GPx)	89
3.14	Medida da Capacidade Antioxidante Total(TRAP)	90
3.15	Avaliação da Concentração dos Metabólitos do Óxido Nítrico	91
3.15.1	Concentração de Nitrato (NO_3^-) em tecido Cardíaco	91
3.15.2	Concentração de Nitrito (NO_2^-) em tecido Cardíac	93
4.	DISCUSSÃO	
4.1	Estudos <i>In Vitro</i>	95
4.2	Estudo <i>In Vivo</i>	99
5.	CONCLUSÕES	117
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	119
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Monocrotalina	26
FIGURA 1.2: Extrutura eletrônica de espécies de Oxigênio (EAO)	30
FIGURA 1.3: Redução monoelétrica do oxigênio formando EAO	31
FIGURA 1.4: Reações em cadeia da lipoperoxidação	35
FIGURA 1.5: Esquema geral das principais fontes celulares de produção e metabolização EAO	36
FIGURA 1.6: Exemplo de reação de detoxificação de Cloro de Dinitrobenzeno (CDNB) através de glutathione S-transferase (GST)	39
FIGURA 1.7: Estrutura básica dos polifenóis	41
FIGURA 1.8: Efeitos protetores dos polifenóis do vinho na parede arterial	43
FIGURA 2.1. Protocolo de tratamento dos animais	57
FIGURA 3.1. Capacidade antioxidante total (TRAP) <i>in vitro</i> no vinho a diferentes diluições	71
FIGURA 3.2. Determinação da capacidade antioxidante total (TRAP) <i>in vitro</i> do suco de uva a diferentes diluições	72
FIGURA 3.3: Determinação da capacidade antioxidante (TRAP) do vinho e suco de uva a diferentes diluições <i>in vitro</i>	73

FIGURA 3.4: Determinação da reatividade antioxidante total (TAR) do vinho e suco <i>in vitro</i>	74
FIGURA 3.5: Determinação da xantina oxidase <i>in vitro</i> do suco e vinho	75
FIGURA 3.6: Ganho de peso (g) nos distintos grupos experimentais durante o período de tratamento	77
FIGURA 3.7: Consumo alimentar (g) nos distintos grupos durante o período de tratamento	78
FIGURA 3.8: Quimiluminescência (QL) em homogeneizado de tecido cardíaco nos diferentes grupos experimentais	85
FIGURA 3.9: Medida da atividade de enzima Superóxido dismutase (SOD) em homogeneizados de tecido cardíaco nos diferentes grupos experimentais	87
FIGURA 3.10: Medida da atividade da enzima catalase (CAT) em homogeneizados de tecido cardíaco nos diferentes grupos experimentais	
FIGURA 3.11: Medida da atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx) em homogeneizados de tecido cardíaco nos diferentes grupos experimentais	89
FIGURA 3.12: Medida da capacidade antioxidante total (TRAP) em homogeneizado de tecido cardíaco nos diferentes grupos experimentais	90
FIGURA 3.13: Concentração de Nitrato (NO_3^-) em homogeneizado de tecido cardíaco nos diferentes grupos experimentais	92
FIGURA 3.14: Concentração de Nitrito (NO_2^-) em homogeneizados de tecido cardíaco nos diferentes grupos experimentais	93
FIGURA 4.1: Estruturas dos distintos flavonóides	96
FIGURA 4.2: Metabolismo da Monocrotalina	100
FIGURA 4.3: Lipoperoxidação produzida pela monocrotalina (MCT)	107

FIGURA 4.4:Mecanismo proposto para explicar as alterações hemodinâmicas 114

FIGURA 4.5: Efeito da MCT em termos de biodisponibilidade de NO, produção de EAO e sinalização intracelular para hipertrofia cardíaca e papel do suco de uva e vinho tinto 115

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1: Análise de Fitoquímicos presentes no suco e uva e no vinho tinto	70
TABELA 3.2: Relação peso úmido/peso seco (em g/g) de pulmão e fígado nos distintos grupos durante o período de tratamento	79
TABELA 3.3: Parâmetros morfométricos nos distintos grupos durante o período de tratamento	81
TABELA 3.4: Medidas hemodinâmicas nos distintos grupos durante o período de tratamento	83

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATP:** Trifosfato de adenosina
- AZO:** 2,2'Azo-bis (2-amidino-propano)
- Ca⁺⁺:** Cálcio
- CAT:** Catalase
- CDNB:** Cloro dinitrobenzeno
- Cps:** Contagens por segundo
- CuZnSOD:** Cobre- Zinco Superoxido dismutase
- Cu⁺:** Cobre
- CuSO₄:** Sulfato de cobre
- PDGF:**Fator de crescimento derivado plaquetário
- DNA:** Ácido desoxirribonucléico
- DHA:** Dehidromonocrotalina
- +dP/dt:** velocidade de contração cardíaca
- dP/dt:** velocidade de relaxamento cardíaco
- EPM:** Erro padrão da média
- ERO:** Espécies Reativas de Oxigênio
- EAON:** Espécies ativas de oxigênio e Nitrogênio
- EAO:** Espécies ativas de Oxigênio
- EAN:** Espécies ativas de Nitrogênio
- EDHF:** Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
- eNOS:** Óxido nítrico sintase endotelial
- ETs:** Endotelinas

ET-1:Endotelina-1

FAD: Flavina adenina dinucleotídeo

Fe⁺⁺: Ferro

K₃Fe(CN):Ferrocianeto de potássio

g: grama

g/mol: grama por mol

GC: Grupo Controle

GI: Grupo Insuficiente

GV: Grupo Vinho

GVI: Grupo Vinho Insuficiente

GS: Grupo Suco

GSI: Grupo Suco Insuficiente

GPx: Glutaciona peroxidase

GR: Glutaciona redutase

GSSG: Glutaciona Oxidada

GSH: Glutaciona reduzida

GSTs Glutaciona S-transferases

GSH- DHP: dehidroretocinidina

G6P: Glicose 6 Fosfato

HCl: Ácido Clorídrico

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

HVD: Hipertrofia ventricular Direita

HVE: Hipertrofia ventricular Esquerda

HC: Hipertrofia cardíaca

HCD: Hipertrofia cardíaca direita

IC: Insuficiência cardíaca

ICC: Insuficiência Cardíaca congestiva

ICD: Insuficiência Cardíaca direita

KCN: Cianeto de potássio

LPO: Lipoperoxidação

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

MCT: Monocrotalina

mg: Miligrama

min: Minuto

mL: Mililitro

mm: Milímetro

mm Hg: Milímetro de mercúrio

mM: Milimolar

M: Molaridade (medida molar da concentração, moles de soluto por litro de solvente)

MnSOD: manganês-Superóxido Dismutase

NaHCO₃: Bicarbonato de sódio

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfatada reduzida

NaOH: Hidróxido de Sódio

NaN₃: Azida Sódica

NO₃⁻: Nitrato

NO₂⁻: Nitrito

NO: Óxido Nitrico

NOS: Óxido Nítrico Sintase

ONOO: Peroxinitrito

O₂^{•-}: Radical Superóxido

O₂: Oxigênio no estado fundamental

OH[•]: Radical Hidroxil

PMSF: Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

PSVD: Pressão sistólica ventricular direita

PDFVD: Pressão diastólica final ventricular direita

PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinase

PGI1: Prostaciclina 1

PUFA: Ácido graxo poliinsaturado

QL: Quimiluminescência

KCl: Cloreto de potássio

KNaC₄H₄O₆: tartarato de sódio e potássio

ROOH: Hidroperóxido

RL: Radical Livre

RLs: Radicais Livres

-SH: grupamento tiol

SOD: Superoxido Dismutase

SUS: Sistema Único de Saúde

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TRAP : Capacidade antioxidante Total

TAR: Medida de reatividade antioxidante total

t-BOOH: Hidroperóxido de Tert-butil

VD: Ventrículo Direito

VEGF: Fator crescimento do endotélio vascular

UV: Raios ultra Violeta

XO: Xantina Oxidase

RESUMO

Foram realizados *estudos in vitro* para verificar a presença de componentes fenólicos, capacidade antioxidante total (TRAP) e a reatividade antioxidante total do suco de uva e vinho tinto. Também foi verificada a propriedade destas bebidas de inibir a produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pela xantina oxidase *in vitro*. Estes estudos comprovaram que o vinho tinto apresenta maior quantidade (TRAP) e qualidade (TAR) de antioxidantes em relação ao suco, assim como maior porcentagem de inibição de produção de $O_2^{\bullet-}$. Em consequência, foi realizado um estudo *in vivo*, utilizando um modelo de insuficiência cardíaca direita (ICD) através da administração de monocrotalina (MCT) na dose de 60mg/kg. Foram utilizados ratos machos Wistar, onde foram investigados os efeitos da administração do suco de uva preta e vinho tinto Cabernet Franc durante 45 dias. Foram avaliados parâmetros morfométricos através da hipertrofia cardíaca direita, esquerda e nível de congestão hepática e pulmonar, parâmetros hemodinâmicos do VD medindo a pressão intraventricular sistólica direita (PSVD), diastólica final ventricular direita (PDFVD) e as respectivas derivadas (+dP/dt e -dP/dt). Seis grupos experimentais foram estabelecidos: Controle (GC), Insuficiente (GI), Vinho (GV), Vinho insuficiente (GVI), Suco (GS) e Suco insuficiente (GSI). As bebidas foram administradas por sonda intragástrica, na quantidade de 20 mL.kg⁻¹.dia⁻¹ de suco e água, e o vinho na concentração de 15 mL.kg⁻¹.dia⁻¹. Os animais aos quais foi administrado vinho, iniciaram o tratamento com suco desde o desmame até 49 dias de idade, devido à bebida ser isenta de álcool, e somente em idade mais avançada (aos 50 dias de vida) se introduziu o vinho. Os grupos GC e GI receberam água nas mesmas condições durante o protocolo experimental.

A administração de MCT induziu hipertrofia de VD, sendo que o tratamento apenas com suco (GSI) não reduz significativamente este efeito como o faz o tratamento com suco e vinho (GVI). Em termos hemodinâmicos, a MCT promoveu elevação da PSVD e da PDFVD, assim como das suas respectivas derivadas. Nos grupos GVI e GSI estas respostas foram significativamente reduzidas, sugerindo uma menor resistência pulmonar e, portanto, menor pós-carga ao VD, com conseqüente redução da hipertrofia e da disfunção ventricular. Em termos de estresse oxidativo, a MCT induziu aumento de lipoperoxidação (LPO) avaliada por quimiluminescência (QL) em relação ao controle (GC). Nos grupos GVI e GSI não houve diferença em relação aos seus respectivos controles, evidenciando uma proteção oferecida por estas bebidas em termos de dano oxidativo cardíaco. A atividade das enzimas antioxidantes também mostrou-se alterada com o tratamento com MCT: a superóxido dismutase (SOD) e a glutathiona peroxidase (GPx) foram reduzidas, enquanto a catalase (CAT) não se alterou. O tratamento com suco e suco e vinho (GSI e GVI, respectivamente) conseguiu recuperar a atividade da GPx em tecido cardíaco, sem mostrar o mesmo efeito na atividade da SOD. Também a capacidade antioxidante total (TRAP) foi significativamente reduzida pela MCT, sendo que nos grupos GVI e GSI este efeito não foi verificado. O nível de metabólitos do óxido nítrico (NO_3^- e NO_2^-) foi igualmente reduzido quando da administração de MCT, efeito este revertido pelo tratamento com suco mais vinho (GVI).

Os resultados demonstram que a administração de suco previamente e suco mais vinho durante o período de desenvolvimento da doença cardíaca (ICD) protegem o miocárdio, provavelmente pela presença de substâncias bioativas, como os flavonóides, nestas bebidas.

ABSTRACT

In vitro studies were performed to verify the presence of phenolic components, total antioxidant capacity (TRAP), and total antioxidant reactivity (TAR) of red grape juice and red wine. It was also verified the property of these beverages of inhibiting the production *in vitro* of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) by xanthine oxidase. These studies proved that red wine contains antioxidants in larger quantity (TRAP) and higher quality (TAR) than juice, as well as higher percentage inhibition of $O_2^{\bullet-}$ production. As a consequence, an *in vivo* study was made using a right cardiac hypertrophy model, by administering monocrotaline (MCT) in the doses of 60 mg/kg. Male Wistar rats were used, in which the effects of administering juice of red grapes and Cabernet Franc red wine for 45 days were investigated. Morphometric parameters were evaluated by means of the right and left cardiac hypertrophy index and the level of hepatic and pulmonary congestion, and hemodynamic parameters of RV by measuring systolic intraventricular pressure (RVSP), end diastolic pressure (RVEDP) and the corresponding derivatives (+dP/dt and -dP/dt). Six experimental groups were established: Control (GC), Heart Failure (GI), Wine (GV), Heart Failure Wine (GVI), Juice (GS), and Heart Failure Juice (GSI). The beverages were administered using an intragastric probe in the quantity of 20 mL/kg body weight / day of juice and water, and wine at a quantity of 15mL/kg body weight/day. For those animals to which wine was administered, the treatment was started with juice from the wean until 49 days of age, due to the absence of alcohol in juice, and only at a later age (50 days of age)

the wine was introduced. The groups GC and GI received water in the same conditions during the experimental protocol.

The MCT administration induced RV hypertrophy, while the treatment based only on juice (GSI) did not reduce significantly this effect, as it happens with the treatment using juice and wine (GVI). In hemodynamic terms, MCT caused an elevation of RVSP and RVEDP, as well as its corresponding derivatives. In the groups GVI and GSI, these responses were significantly reduced, suggesting a lower pulmonary resistance and therefore lower afterload to the RV, with a consequent reduction of hypertrophy and ventricular dysfunction. In terms of oxidative stress, MCT induced an increase in lipid peroxidation (LPO), evaluated by chemiluminescence (CL), as compared to control (GC). In the GVI and GSI groups there was no difference in relation to their respective control groups, indicating a myocardial protection against oxidative damage provided by these beverages. The activity of the antioxidant enzymes was also changed by the MCT treatment: superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activities were reduced, while catalase (CAT) remained unaltered. The treatment with juice and juice plus wine (GSI and GVI, respectively) was able to recover the GPx activity in cardiac tissue, without showing the same effect in the SOD activity. TRAP was significantly reduced by MCT, while in GVI and GSI groups this effect was not verified. The level of nitric oxide metabolites (NO_3^- and NO_2^-) was equally reduced with the MCT administration, and this effect was reverted by the treatment with juice plus wine (GVI).

The overall results show that the administration of juice prior to and juice plus wine during the period of right ventricle heart failure development, protects the myocardium, probably by the presence of bioactive substances, like the flavonoids, in these beverages.

1. INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é classicamente definida como a falência do coração em manter um débito cardíaco adequado às necessidades metabólicas tissulares caracterizada pela elevação das pressões pulmonar e venosa sistêmica. Descrita, como uma síndrome em que ocorre importante estimulação neurohumoral, caracterizada pela ativação do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina-aldosterona, além de alterações da musculatura esquelética (Negrão & Barreto, 1998).

1.1 Epidemiologia

As doenças cardiovasculares têm seu impacto efetivo quanto ao desenvolvimento das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil em termos de importância sócio-econômica. Segundo dados do Datasus do ano 2001, o número de óbitos por doenças cardiovasculares no Brasil foi de 27,5% . Este quadro social poderá aumentar com maior ou menor velocidade, levando em consideração as mudanças nas estratégias governamentais promovendo e prevenindo a saúde por meio de uma população mais conhecedora das causas.

Na população mundial, a prevalência da Insuficiência Cardíaca (IC) é de 1 a 2% e constitui um dos maiores problemas de saúde pública. Dentre os altos custos despendidos para os cuidados com saúde, estima-se que mais de 8 bilhões de dólares sejam gastos anualmente com pacientes portadores de IC nos Estados Unidos.

No Brasil, segundo dados do Sistema Único de Saúde (SUS), a IC acomete 2 milhões de pacientes, com uma incidência de 240 mil novos casos por ano. A mortalidade oscila em torno de 10% da população total e de 30 a 40% para aqueles adequadamente tratados (Guimarães 1999). Atualmente, cerca de 5 milhões de pacientes são portadores de IC nos Estados Unidos, com 500.000 novos casos diagnosticados a cada ano (Hunt, 2001; Jessup & Brozena, 2003). Juntamente com a explosão nos custos de cuidados com a saúde, estima-se que os Estados Unidos tenham um gasto anual de 500 milhões de dólares em medicamentos para o tratamento da insuficiência cardíaca (IC) (Hunt, 2001). Nos últimos 10 anos, o número anual de hospitalizações nos Estados Unidos por diagnóstico primário de IC aumentou de 550.000 para 900.000 (Haldeman & Croft 1999). No Framingham Heart Study foi demonstrado que a insuficiência cardíaca é mais comum em homens do que em mulheres, e que aumenta consideravelmente com a idade. Os dados desse estudo revelaram que existem 3 casos por 1000 homens em idades de 50 a 59 anos e 2 casos por 1000 mulheres na mesma idade. Já em homens com mais de 80 anos existem 27 casos por 1000 e 22 casos por 1000 mulheres quando ajustados para idade (Ho et al., 1993).

Apesar do notável declínio na mortalidade por doenças cardiovasculares nos últimos 30 anos, ambos morbidade e mortalidade por insuficiência cardíaca congestiva (ICC) têm mostrado aumento. Têm havido consideráveis avanços no entendimento das alterações funcionais associadas com as fases precoces de hipertrofia miocárdica e estágios terminais de insuficiência cardíaca. Contudo, os mecanismos precisos envolvidos na evolução da disfunção cardíaca e

insuficiência cardíaca congestiva (ICC) permanecem desconhecidos. Embora cerca de 14 a 34% dos casos de insuficiência cardíaca sejam devidos ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca direita, os mecanismos envolvidos no seu desenvolvimento ainda não são bem entendidos (Comini et al., 1995; Kuchel et al., 1987).

1.2 Patogênese da Insuficiência Cardíaca

A insuficiência cardíaca (IC) é um estado clínico ou síndrome que pode resultar de um amplo espectro de enfermidades que comprometem o fluxo sanguíneo coronário em relação às necessidades metabólicas do miocárdio. A IC pode se desenvolver em alguns pacientes somente sob condições de acentuada demanda metabólica; em outros, pode estar presente mesmo sob condições normais de demanda metabólica basal, tais como, hipertensão, defeitos na ação de válvulas cardíacas, cardiomiopatias idiopáticas, infarto do miocárdio; assim como, por conseqüências secundárias de determinadas doenças como a diabetes ou intervenções com fármacos como quimioterápicos (McAlister & Teo, 1997).

A anormalidade primária surge freqüentemente em qualquer dos ventrículos, esquerdo ou direito. Quando o ventrículo direito é insuficiente, o aumento resultante da pressão venosa sistêmica, causa edema periférico e a ejeção diminuída de sangue para a artéria pulmonar reduz o débito do ventrículo esquerdo. Na insuficiência ventricular esquerda, a pressão venosa pulmonar aumentada impede o fluxo do sangue para fora dos pulmões que causa dispnéia e aumenta a pressão capilar pulmonar. Como esta pressão elevada é transmitida através da circulação pulmonar, a elevação resultante da pressão da artéria pulmonar pode prejudicar a ejeção do ventrículo direito (Berne & Levy, 1998).

Durante seu desenvolvimento, o miócito cardíaco passa por várias modificações e, na fase adulta, pode se alterar em resposta a determinadas doenças. A hipertrofia do miocárdio é provavelmente o melhor exemplo de adaptação da estrutura celular à estimulação (Terracio et al., 1998). Inicialmente, a hipertrofia resulta em mais miofibrilas disponíveis para contração, e também em aumento do número de mitocôndrias que suprem ATP adicional para o cardiomiócito (Brady & Terzic, 2000). Com isso, ocorre um aumento da contratilidade no coração hipertrófico; entretanto, com o passar do tempo, e persistindo a sobrecarga, ocorre deterioração da função contrátil (o consumo pode ultrapassar a produção de energia) o coração se dilata e se desenvolve a insuficiência cardíaca (Walsh & Dorn, 1998). As bases celulares do aumento da massa cardíaca envolvem a hipertrofia dos cardiomiócitos existentes, bem como sua proliferação (hiperplasia) (Zak, 1973). A hipertrofia secundária à sobrecarga crônica envolve aumento no comprimento/espessura dos cardiomiócitos, expressão gênica alterada, alterações na composição das proteínas contráteis, e indução de marcadores embrionários (Brady & Terzic, 2000). Os mecanismos que regulam o crescimento celular, como todas as funções reguladoras vitais, são extremamente complexos. Assim, o estímulo pelo qual a sobrecarga inicia a hipertrofia implica alterações em diversos mecanismos de controle que traduzem o aumento de trabalho do coração num sinal que aumenta o crescimento celular.

Uma das conseqüências do desenvolvimento do processo de insuficiência cardíaca é um aumento gradual da pressão diastólica final e diminuição da pressão sistólica ventricular final. Na tentativa de compensar este declínio na função de bombeamento, vários mecanismos são deflagrados, entre estes, o que controla a resposta de remodelamento do miócito cardíaco é o mais amplamente conhecido (Tombe, 1998). Para compensar a perda de células miocárdicas, mecanismos hemodinâmicos e neuro-hormonais são ativados com o objetivo de aumentar a força contrátil do miocárdio não lesado e, dessa forma, preservar a função cardíaca. Inicialmente, a incapacidade de esvaziamento dos ventrículos durante a sístole resulta em um aumento das pressões de enchimento

ventriculares direito e esquerdo, aumenta a distensão diastólica das células miocárdicas não lesadas, levando ao aumento de sua contração (princípio de Frank-Starling). Por outro lado, a diminuição do volume sistólico ejetado para a raiz aórtica leva à ativação do sistema nervoso simpático, com resultante estimulação dos receptores β -adrenérgicos miocárdicos, aumentando a força e a frequência da contração, envolvendo vias intracelulares cálcio-dependentes.

Atualmente, a insuficiência cardíaca tem sido vista como uma doença da circulação e não apenas do coração. Quando o débito cardíaco cai após agressão miocárdica, mecanismos neuro-hormonais são ativados com o objetivo de preservar a homeostase circulatória. Embora originalmente vista como uma resposta compensatória benéfica, a liberação endógena de neuro-hormônios vasoconstritores parece exercer papel deletério no desenvolvimento da insuficiência cardíaca congestiva, pelo aumento da sobrecarga de volume e da pós-carga do ventrículo com contratilidade já diminuída. Isso leva à progressão da insuficiência cardíaca já existente. Esses neuro-hormônios podem exacerbar as anormalidades metabólicas já existentes, ocasionando o aparecimento de arritmias cardíacas. Por esses mecanismos, a ativação neuro-hormonal contribui de maneira significativa para os sintomas de insuficiência cardíaca, assim como está envolvida na alta mortalidade dos portadores dessa doença (Schlant et al., 1998).

Apesar dos mecanismos hemodinâmicos e neuro-hormonais visarem ao aumento do inotropismo do coração lesado, aumenta por outro lado a tensão diastólica da parede vascular, levando à alteração de sua arquitetura e ao aumento de seu consumo energético. Para evitar esses efeitos estruturais e funcionais, a circulação tenta regular a evolução da dilatação ventricular e a ativação simpática. Inicialmente, o aumento da tensão diastólica na parede ventricular induz a produção de proto-oncogenes específicos, que levam à síntese de novas proteínas miofibrilares, que leva ao aumento da espessura da parede ventricular reduzindo a dilatação ventricular por distribuir o excesso de tensão por

meio do aumento do número de sarcômeros. Assim, a hipertrofia cardíaca reduz o gasto energético do coração com sobrecarga volumétrica, às custas, de aumento da eficiência contrátil. Por outro lado, a distensão atrial durante a diástole, com aumento da pressão atrial, estimula os receptores cardiopulmonares que inibem a via eferente simpática do centro vasomotor, situado no sistema nervoso central, levando a sua supressão.

Por meio de combinações entre dilatação e hipertrofia ventricular e da ativação de forças vasoconstritoras e vasodilatadoras, o organismo busca equilíbrio hemodinâmico e neuro-hormonal com o objetivo de restaurar a função cardíaca às custas de mínimo gasto energético.

1.3 Modelo de Insuficiência Cardíaca por Monocrotalina

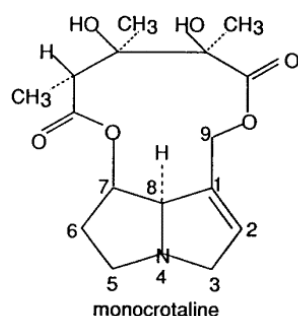


Figura 1.1 Monocrotalina (Adaptado Taylor et al., 1997)

Diferentes modelos de hipertrofia ventricular direita foram criados e caracterizados. O alcalóide monocrotalina (MCT) (Fig. 1.1) tem sido utilizado para produzir hipertensão pulmonar, seguida de sobrecarga de pressão no ventrículo direito, hipertrofia ventricular direita e eventualmente insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (Pan et al., 1993). A monocrotalina (MCT) é um alcalóide

pirrolizidina, presente numa variedade de plantas em todo o mundo, mais freqüentemente encontrada nas sementes de *Crotalaria spectabilis* (Smith & Culvenor, 1981). Uma única injeção intraperitoneal (60-90 mg/kg) de MCT em ratos produz, nas 2 ou 3 semanas subseqüentes, características clínicas que se assemelham à hipertensão pulmonar idiopática em humanos (Kay et al., 1982; Rodeheffer & Lerman, 1992; Steven et al., 2000). Brunner (1999) e Mathew (1995) utilizando injeção subcutânea de MCT (50 e 80 mg/kg, respectivamente) em ratos, constataram que, após uma semana da administração, não foram observadas alterações endógenas no metabolismo do óxido nítrico (NO), e nos níveis de endotelina-1 (ET-1). Os vasos pulmonares estavam normais, não havia evidência de hipertensão pulmonar ou hipertrofia ventricular direita. Duas semanas após a administração da MCT, ocorreu uma deterioração da função endotelial, resultante da inibição da liberação de NO endotélio-dependente e elevação dos níveis de ET-1 nos vasos pulmonares. Segundo Mathew (1995), no modelo de trabalho que utilizou na Insuficiência Cardíaca congestiva (ICC) com MCT, sugere que a ET-1 é um potente vasoconstritor e inotrópico positivo, estando aumentada 2 a 3 vezes na insuficiência cardíaca. A injúria endotelial não está limitada a receptores isolados, mas a uma disfunção endotelial generalizada. Estas alterações estão associadas com a hipertensão pulmonar e hipertrofia ventricular direita. A ET-1 estimula o crescimento de cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos e a angiotensina II induz a expressão e secreção de ET-1 em cardiomiócitos e miócitos sugerindo um estresse mecânico. A secreção de ET-1 e angiotensina II resultam em uma resposta sinérgica de hipertrofia, sugerindo que a ET-1 atua como fator da hipertrofia miocárdica (Brunner, 1999). Este modelo é ideal porque não são necessárias intervenções cirúrgicas e a hipertrofia cardíaca direita e a insuficiência cardíaca direita se desenvolvem rápida e reproduzivelmente (Pan et al., 1993). Após três semanas de tratamento, se observam elevadas a pressão sistólica ventricular direita (PSVD) e a pressão diastólica final direita (PDFVD), sugerindo uma fase compensatória onde o débito cardíaco é mantido através do bombeamento de sangue contra uma pressão elevada através da circulação pulmonar estreitada. Quando a MCT é transportada para os pulmões, ela induz

uma síndrome vascular pulmonar, caracterizada por elevação da pressão na artéria pulmonar (Thomas et al., 1998). A depressão no crescimento corporal dos animais é outro sinal dependendo da dose que se torna aparente após alguns dias da administração de MCT. Este efeito é provavelmente devido a distúrbios gastrointestinais e/ou hepáticos induzidos pela intoxicação por MCT. A MCT é bioativada no fígado a um composto intermediário, a dihidromonocrotalina, que afeta vários tecidos (Todorovich-Hunter et al., 1992; Wilson et al., 1999), induzindo hepatotoxicidade, pneumotoxicidade e efeitos nefrotóxicos (Medeiros et al.;2000).

1.4 Hipertensão Pulmonar

A hipertensão pulmonar pode ocorrer como um fenômeno isolado ou associado a várias alterações cardiopulmonares e está relacionada a altos níveis de morbidade e mortalidade. Ela é uma condição progressiva caracterizada por um aumento da resistência vascular pulmonar e definida como um aumento da pressão arterial média que em seu processo final leva à insuficiência cardíaca e morte (Mathew et al., 1995).

Teorias a respeito dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na hipertensão pulmonar têm dado atenção ao endotélio e células do músculo liso, à produção de fatores químicos e resposta a diferentes mediadores (Veyssier-Belot & Cacoub, 1999).

Com o descobrimento das endotelinas (ETs) permitiu-se o entendimento da sua patogênese. As ETs são uma família de peptídeos que se formam nas células endoteliais e algumas em células vasculares. Todas são potentes vasoconstritoras. Estes compostos induzem a contração do músculo liso, ativado inicialmente pela fosforilação que abre os canais de Ca^{+2} e produzem um processo de constrição. As células endoteliais têm receptores principalmente

para a ET-1. Os mecanismos da vasoconstrição medida por estes receptores ainda não são bem compreendidos (Gschwend et al., 2003).

Evidências indicam um papel potencial das ETs na disfunção endotelial assim como na patofisiologia da doença vascular pulmonar que é precedida de alterações morfológicas (Runo et al., 2003). Níveis elevados de ET-1 têm sido encontrados em pulmões de pacientes com hipertensão pulmonar (Hervé et al., 1998), e em ratos com hipertensão pulmonar idiopática (Mathew et al., 1997).

Os níveis plasmáticos das endotelinas estão elevados: 1- em pacientes com hipertensão primária e secundária (Runo et al., 2003); 2- em modelos experimentais que produzem hipóxia crônica (DiCarlo, 1995), 3- com a administração de monocrotalina (Miyachi 1993; Prié et al., 1997); 4- com insuficiência cardíaca congestiva induzida por infarto, que tem sido associado com aumento da expressão da ET-1 no pulmão (Sakai et al., 1996 e Nguyen et al., 1998).

A reduzida produção de NO também pode estar envolvida na hipertensão pulmonar induzida pela MCT (Mathew et al., 1997). O NO produzido no endotélio é um segundo mensageiro. Ele atua na musculatura lisa, se houver estímulo, como por exemplo a acetilcolina, que irá liberar o óxido nítrico.

O óxido nítrico é gerado quando a L-arginina é convertida à L-citrulina, reação esta catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Michel & Feron, 1997; Sasaki et al., 2004). A NOS consiste de três isoformas: a nNOS (neuronal); a iNOS (induzível) que foi isolada em células de macrófagos e é expressa em diversas células como miócitos cardíacos, células gliais e células do músculo liso vascular; e a eNOS (endotelial) encontrada em miócitos cardíacos, plaqueta, cérebro. O papel fisiológico no tônus vascular e regulação da função plaquetária são atribuídos a eNOS. Logo, sua inativação implica em risco de vasoespasmo e trombose.

Estudos indicam que ambos, óxido nítrico e endotelina-1, têm um papel relevante na patogênese da hipertensão pulmonar (Runo et al., 2003), relacionadas a estas condições fisiológicas, ocorre a produção de espécies ativas de oxigênio e nitrogênio (EAON), e a ativação dos sinalizadores do processo redox que induzem uma série de genes regulatórios da função vascular.

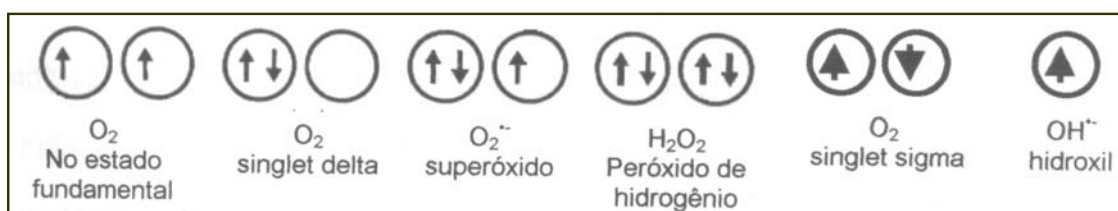


Figura 1.2: Estrutura eletrônica de espécies reativas de oxigênio (EAO). Só mostramos os dois orbitais π^* externos. Os demais orbitais internos ($\sigma 1s$, $\sigma^* 1s$, $\sigma 2s$, $\sigma^* 2s$, $\sigma 2p$ e $\pi 2p$) encontram-se todos plenamente ocupados. As flechas representam o sentido dos spins. (Adaptado Halliwell & Gutteridge, 1999).

Nas células endoteliais, a produção excessiva EAO gera uma série de produtos oxidativos induzindo apoptose, que gera uma perda de células endoteliais, e como consequência resulta numa disfunção endotelial.

As espécies ativas de oxigênio (EAO) são aquelas derivadas da redução monoelétrica do oxigênio (figura 1.2): radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o radical hidroxil (OH^{\bullet}), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o oxigênio singlet, um estado excitado do oxigênio molecular que pode apresentar-se de duas formas: o estado sigma (mais reativo), e o estado delta (não é radical) (figura 1.3 Bast et al, 1991).

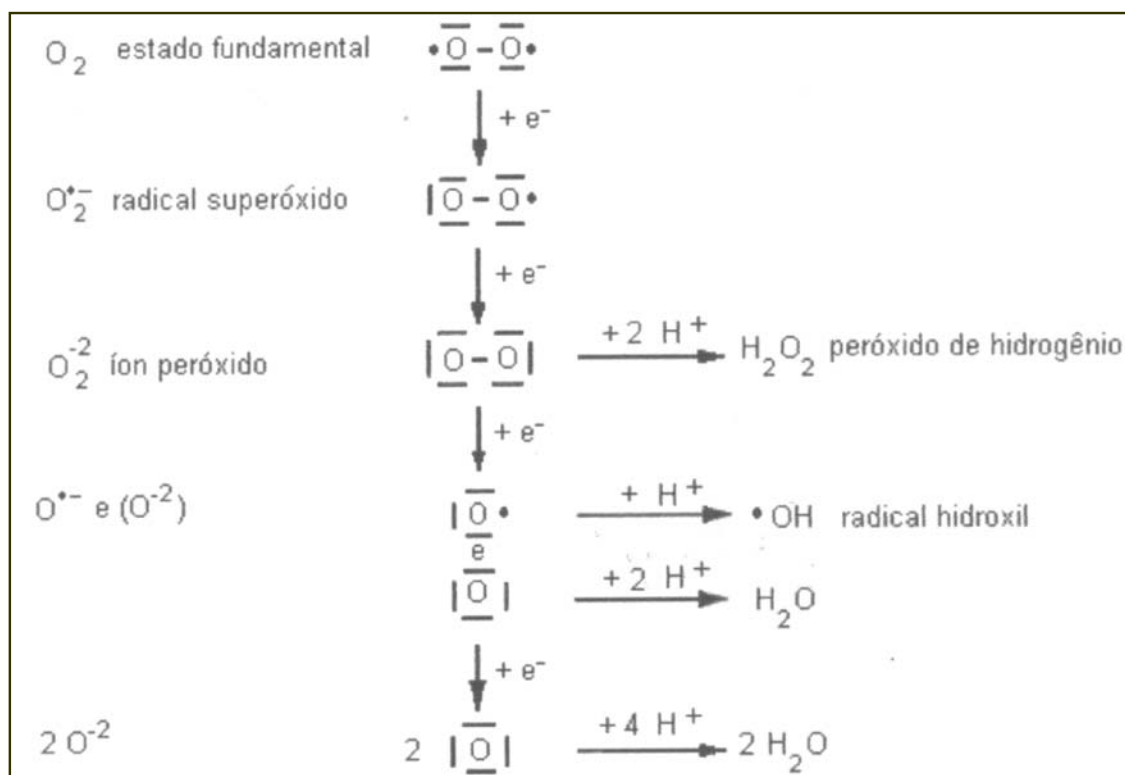
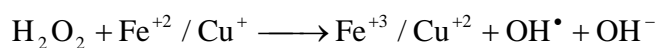


Figura 1.3: Redução monoelétrica do oxigênio formando EAO (Bast et al., 1991).

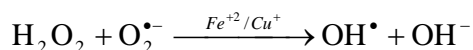
O ânion radical superóxido (O₂^{•-}) é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigênio à água; a partir do mesmo serão formadas as demais EAO. A sua dismutação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), (Yu, 1994). O peróxido de hidrogênio é o segundo intermediário do processo oxidativo, podendo ser produzido indiretamente, pela redução univalente do oxigênio, seguida da dismutação do ânion radical superóxido e/ou diretamente, pela redução bivalente do oxigênio molecular. Apesar de não ser um radical livre, esta espécie ativa pode originar o radical hidroxil, o que seria bastante prejudicial à célula, além de ter a propriedade de ser muito permeável através das membranas biológicas (Del Maestro, 1980; Halliwell & Gutteridge, 1999). O radical hidroxil (OH[•]), por sua vez, é um dos mais potentes oxidantes dos sistemas biológicos. Pode reagir com biomoléculas, como lipídios insaturados e o DNA, apesar de seu curto tempo de meia vida (Halliwell & Gutteridge, 1999).

O radical hidroxil é formado através de reações que necessitam a presença de íons metais de transição como o ferro e o cobre. A reação do peróxido de hidrogênio com íons ferroso ou cúprico é chamada de reação de Fenton (1894) que leva à produção do radical hidroxil, altamente reativo (Reação 1.1).



Reação 1.1: Reação de Fenton

O radical hidroxil também pode ser formado a partir da reação do ânion superóxido com o peróxido de hidrogênio em presença de íons divalentes de metais de transição, reação esta descrita por Haber-Weiss em 1934 (Reação 1. 2).



Reação 1.2: Reação de Haber – Weiss

Além das EAO, há outros radicais livres (RLs) que desempenham um importante papel na fisiologia e patologia humana, são as espécies ativas do nitrogênio (EAN). O óxido nítrico (NO) é, fisicamente, um radical livre (RL), considerando o elétron desemparelhado. Sua característica como radical livre é limitada, pois não são conhecidas reações de propagação do NO. Por outro lado, o NO reage facilmente com o radical superóxido produzindo o peroxinitrito (ONOO⁻), numa reação de terminação da lipoperoxidação (Boveris, 1998).

O NO está relacionado com várias ações cardioprotetoras como, por exemplo, vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e inibição do crescimento de células do músculo liso vascular (Moncada, 1991; Dubey et al., 1995).

1.5 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo pode ser definido como “um distúrbio do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante em favor dos pró-oxidantes, levando ao dano potencial” (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Em princípio, o estresse oxidativo pode resultar de:

- 1 – Diminuição dos antioxidantes – por exemplo: diminuição da atividade das enzimas de defesa antioxidante como cobre-zinco superóxido dismutase (CuZnSOD), manganês-superóxido dismutase (MnSOD) ou glutatona peroxidase (GSH-Px) ou a deficiência nutricional de antioxidantes ou outros constituintes dietéticos essenciais pela inadequada ingestão ou absorção dos nutrientes da dieta (alfa-tocoferol, ácido ascórbico, aminoácidos contendo enxofre necessário para a síntese de glutatona, ou riboflavina, necessária para a produção de FAD, um cofator da glutatona redutase) (Zhang et al., 2001);
- 2 – Produção aumentada de EAO/EAN, pela exposição elevada ao O₂, a presença de toxinas que são metabolizadas produzindo EAO/EAN, ou excessiva ativação de sistemas “naturais” de produção de EAO/EAN como a ativação demasiada de células fagocíticas nas doenças crônicas inflamatórias, como artrite reumatóide ou colite ulcerativa.

O estresse oxidativo pode causar dano a todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios. O principal alvo celular do estresse oxidativo pode variar dependendo da célula, do tipo, de estresse imposto e da intensidade do mesmo. O estresse oxidativo intenso pode produzir danos irreversíveis levando à morte celular (Halliwell & Gutteridge, 1999).

1.6 Efeitos Biológicos dos Radicais Livres

Por apresentarem grande número de ligações insaturadas, os lipídios de membrana são um alvo preferencial dos radicais livres. Este processo é conhecido

como Lipoperoxidação (LPO) e resulta em reações em cadeia. As reações em cadeia têm três etapas: iniciação, propagação e terminação (figura 1.4) (Meerson et al., 1982; Machlin & Bendich, 1987; Halliwell & Gutteridge, 1989).

A LPO constitui-se num processo importante na renovação das membranas celulares, sendo também essencial para biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos, assim como na fagocitose, pinocitose. No entanto, este processo pode levar a profundas alterações celulares tais como: mudanças no microambiente lipídico de enzimas ligadas à membrana nos canais iônicos e receptores, ativando ou inibindo a atividade dessas proteínas; b) formação de novos canais de permeabilidade; c) formação de ligações cruzadas entre proteínas e fosfolipídios, inativando-os irreversivelmente; d) oxidação dos grupos -SH nos sítios ativos de enzimas ligadas à membrana ocasionando perda de suas funções. Dependendo do grau de severidade, a LPO pode causar desde alterações na permeabilidade até perda da função secretória e morte celular (Meerson, et al. 1982). Além disso, se a LPO atingir a membrana lisossomal pode haver a liberação de enzimas lisossômicas e fosfolipases, acelerando a degradação das membranas. Em adição, as alterações na permeabilidade podem levar a um acúmulo de cálcio intracelular, o que ativaria as fosfolipases cálcio-dependentes, ocasionando a formação de um ciclo vicioso (Richter & Frei, 1988 Apud Bauermann, 2000).

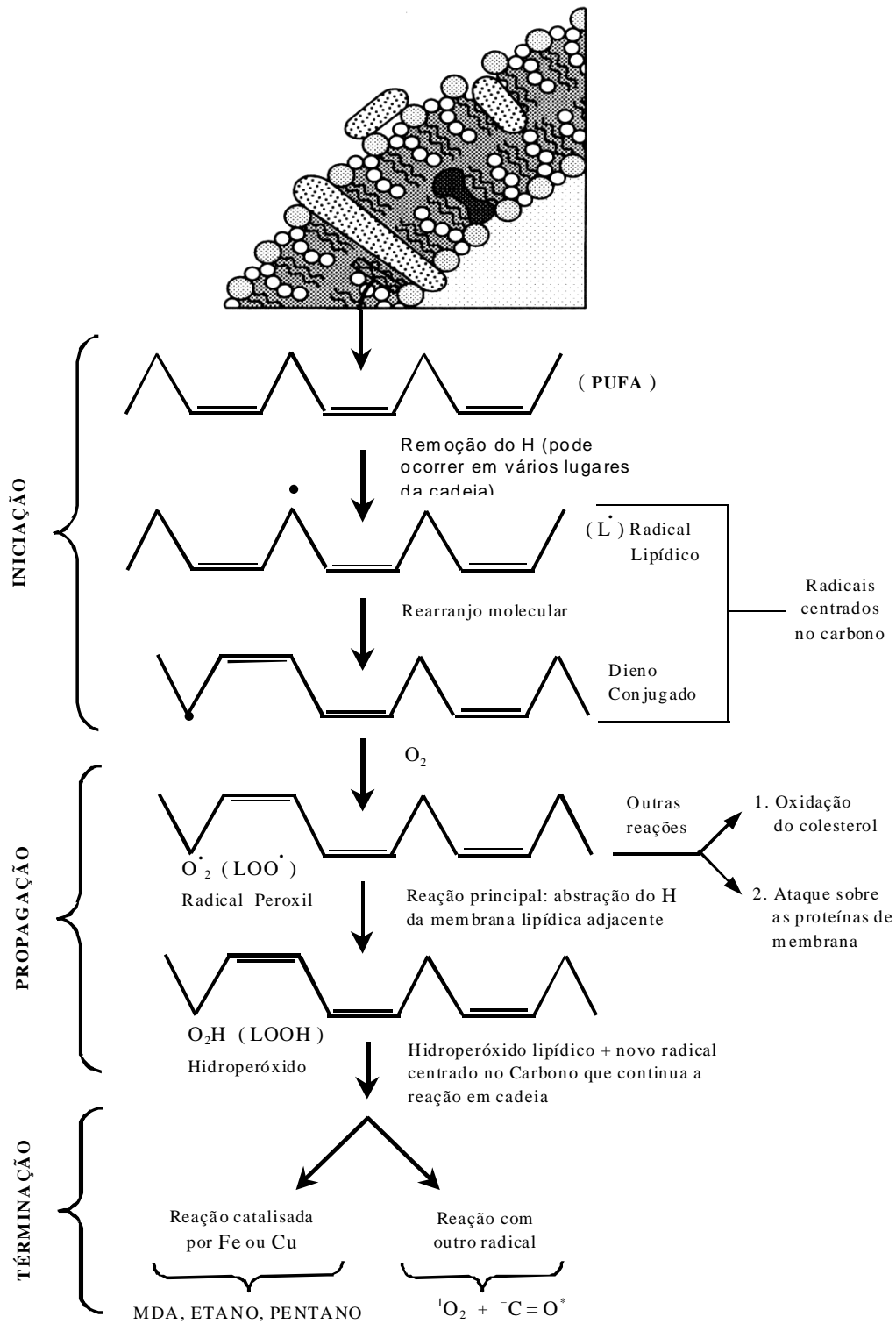


Figura 1.4: Reações em cadeia da lipoperoxidação (Adaptado de Bauermann, 2000; Halliwell & Gutteridge, 1999).

1.7 Sistemas de Defesa Antioxidante

Os organismos aeróbios possuem sistemas de defesa para protegerem-se contra os efeitos causados pelas EAO. Substâncias que neutralizam a ação dos radicais livres na fase de iniciação ou propagação da lipoperoxidação, levando à formação de produtos menos tóxicos, são chamadas de seqüestradoras (*scavengers*) como as enzimas, tocoferóis e polifenóis. Aquelas que atuam absorvendo a energia de excitação dos radicais livres, neutralizando-os, são chamadas de quenchers como os carotenóides e o ácido ascórbico. O sistema de defesa antioxidante é composto de elementos enzimáticos e não enzimáticos (Figura 1.5).

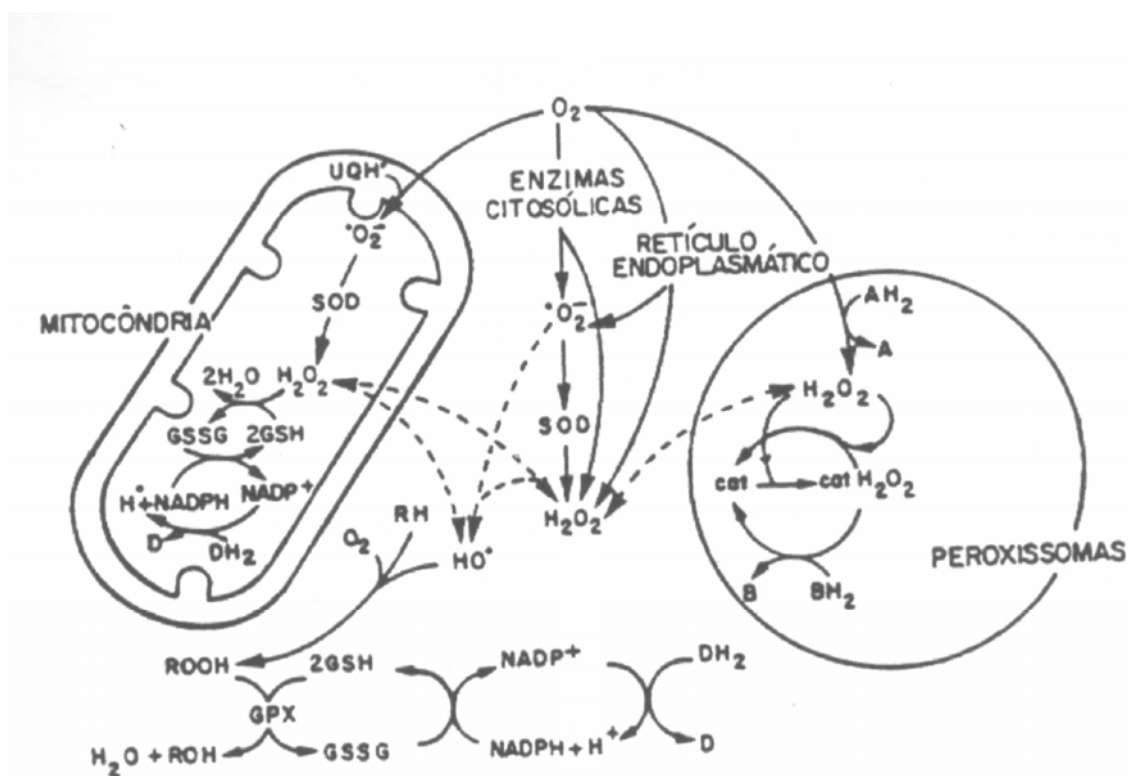
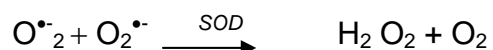


Figura 1.5: Esquema geral das principais fontes celulares de produção e metabolização das EAO. GSSG= Glutationa Oxidada; GSH= glutatona reduzida; DH₂ e D= sistemas redutores de NADP não específicos; SOD = superóxido dismutase; GPx = glutatona peroxidase; CAT = catalase; B e BH₂ = doadores de hidrogênio (Adaptado de Chance et al., 1979).

1.7.1 Antioxidantes Enzimáticos

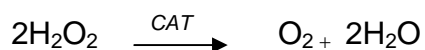
Dentre as defesas enzimáticas responsáveis pela detoxificação das espécies ativas de oxigênio (EAO) salientam-se três enzimas: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx) (Sies, 1997).

O ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigênio à água; a partir do mesmo serão formadas as demais EAO. A sua dismutação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), (Reação 1.3) (Yu, 1994). O peróxido de hidrogênio é o segundo intermediário do processo oxidativo, podendo ser produzido indiretamente, pela redução univalente do oxigênio, seguida da dismutação do ânion radical superóxido e/ou diretamente, pela redução bivalente do oxigênio molecular.



Reação 1.3: Metabolização do Radical Superóxido pela SOD

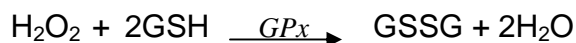
Nos peroxissomas, há a presença de catalase (CAT), uma hemoproteína que reduz cataliticamente o peróxido de hidrogênio a água (Reação 1.4).



Reação 1.4: Metabolização do H_2O_2 pela Catalase

Entretanto, há outros mecanismos para tratar com o fluxo intracelular de H_2O_2 em todos os tecidos. O maior sistema intracelular de decomposição de H_2O_2 é a glutathiona peroxidase (GPx). A família das glutathionas peroxidases (GPx) removem o H_2O_2 acoplando sua redução à água com a oxidação da glutathiona reduzida (GSH) (Reação 1.5). A GPx se utiliza de uma variedade de doadores de elétrons e também de glutathiona reduzida (GSH), esta por sua vez pode ser oxidada (GSSG) pelo peróxido de hidrogênio, removendo-o e formando água

(Reação 1.6). A glutathione peroxidase também catalisa a redução de lipoperóxidos, prevenindo, desta forma, a lipoperoxidação (LPO) (Del Maestro, 1980; Southorn Powis, 1988).



Reação 1.5: Redução do H_2O_2 à água catalisada pela GPx

A GPx atua acoplada a enzima glutathione reductase (GR) que, por sua vez, catalisa a redução de GSSG usando NADPH como enzima (Reação 1.6).



Reação 1.6: Redução de hidroperóxido orgânico (ROOH) à água catalisada pela GPx

Há dois tipos de GPx: uma utiliza selênio como cofator, a qual é encontrada tanto na mitocôndria como no citosol a outra; um selênio independente, que se encontra apenas no citosol e metaboliza exclusivamente hidroperóxido orgânicos (Reação 1.6).

A GPx tem alta atividade no fígado e nos eritrócitos, moderada atividade no coração e nos pulmões e baixa atividade no músculo (Mills, G.C., 1960).

Outra classe de enzimas que também tem um importante papel fisiológico na detoxificação são as enzimas chamadas glutathione S-transferases (GSTs). Estas enzimas agem na detoxificação de potentes agentes alquilantes, incluindo compostos farmacologicamente ativos como herbicidas, pesticidas e xenobióticos. Como pode ser visto na figura 1.6, as GSTs catalisam a reação destes compostos (no exemplo, o cloro dinitrobenzeno) com o grupo -SH da glutathione,

neutralizando assim seus sítios eletrofílicos e transformando-os em produtos mais hidrossolúveis, que são mais facilmente metabolizáveis (Habig, 1974).

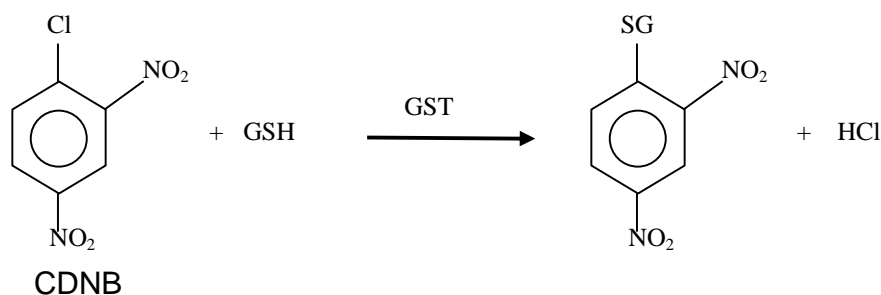


Figura 1.6: Exemplo de reação de detoxificação do cloro dinitrobenzeno (CDNB) através da glutathiona S-transferase (GST).

1.7.2 Antioxidantes Não Enzimáticos

Existe uma variedade de antioxidantes não enzimáticos que previnem o dano dos RL nos tecidos. Estes, podem ser lipofílicos como tocoferóis, carotenóides, polifenóis, e os hidrofílicos como o ascorbato, glutathiona, indóis e catecóis. O α -tocoferol, também denominado vitamina E, é um antioxidante lipossolúvel eliminador de reação em cadeia de elevada importância: ligado à membrana da célula; reage com o radical superóxido, radical hidroxil, radical peroxil convertendo-os em formas menos reativas, agindo como scavenger (Sies & Murphy, 1991). Reage também com oxigênio singlet, absorvendo a energia de excitação com ação de quencher (Kaiser et al., 1990). O β -caroteno é o quencher mais potente do oxigênio singlet, impedindo a formação de lipídios hidroperóxidos (Krinsky, 1989). A vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel eliminador de reação em cadeia; reage diretamente com o superóxido e com oxigênio singlet; regenera o tocoferol, quando interage com o radical tocoferil convertendo-se em radical ascorbil, forma mais estável (Bisby, 1990; Sies, & Murphy, 1991). Estudos têm atribuído atividade antioxidante a uma variedade de componentes bioativos denominados polifenóis presentes naturalmente em alimentos de origem vegetal.

Tem-se demonstrado uma relação inversa entre a ingestão de frutas e vegetais e a incidência de doenças cardiovasculares e câncer (Rice-Evans et al, 1997).

1.8 Poder Antioxidante dos Polifenóis

Os polifenóis incluem uma grande família com mais de 4000 metabólitos secundários em plantas, que compreendem cinco subclasses: antocianinas, flavonóis, flavonas, catequinas e flavononas (Merken et al., 2000) com variedade de compostos, entre eles os flavonóides encontrados em muitas plantas, às quais se tem dado grande atenção, por sua atividade antioxidante. Os componentes fenólicos são importantes para as plantas fisiologicamente por lhes atribuírem a resistência a microorganismos e insetos, lhes dão a pigmentação e características organolépticas (odor e sabor), além de preservar sua integridade devido à exposição contínua ao estresse ambiental causado principalmente por temperaturas elevadas e raios solares UV (Penny, 2002; Visioli et al., 2000; Bocco et al., 1998).

A estrutura química dos polifenóis é fundamental para suas propriedades biológicas: atividade antioxidante, interações específicas com os receptores celulares e sua biodisponibilidade, entre outras (Jayaprakasha et al., 2001). Os polifenóis apresentam mais de um anel aromático com cada um contendo pelo menos um grupo hidroxil, que lhes confere propriedade antioxidante (Figura 1.7) (Noroozi et al., 1998). Seu papel está relacionado com sua estrutura básica e variação química (Wang, 2004). Os polifenóis podem atuar como scavengers de RL, quelar metais de transição, estabilizar e deslocar os elétrons desemparelhados dos radicais livres (Ndiaye et al., 2003; Rice-Evans et al., 1997). Estudos *in vitro* têm mostrado que sua capacidade antioxidante é mais efetiva que das vitaminas C e E (Rice-Evans et al., 1997).

Os polifenóis são antioxidantes importantes presentes nos alimentos e bebidas que fazem parte da nossa alimentação diária. Investigações têm sugerido associações quanto ao consumo destes componentes e prevenção de doenças, sendo que estes dados têm aumentado o interesse em estudá-los.

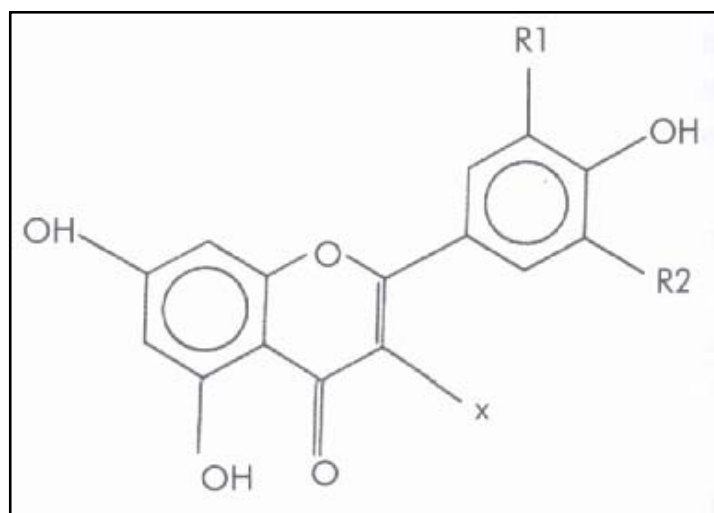


Figura 1.7 – Estrutura Básica dos Polifenóis (Adaptado Rice-Evans et al, 1997).

1.9 Os Polifenóis da Uva em Doenças Cardiovasculares e Hipertensão Pulmonar

Numerosos estudos prospectivos em diversas populações têm mostrado uma relação inversa entre o consumo de vinho tinto e doenças cardiovasculares (St Leger et al., 1979; Renaud & Gueguen 1998; Gronbaek et al., 2000). Embora, os mecanismos pelos quais o vinho tem proporcionado efeitos benéficos ainda não sejam bem compreendidos, muitos destes se atribuem aos constituintes polifenólicos (Luz et al., 1999). Os polifenóis da uva e do vinho tinto têm sido relacionados à inibição *in vitro* da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Frankel et al., 1995; Jayaprakasha et al., 2001), podendo representar proteção efetiva contra doenças cardiovasculares,

além de aumentarem a formação de NO e fator anti-aterosclerótico nas células endoteliais, com importante vasoproteção (Andriambelosom et al., 1997), inibem a agregação plaquetária, participam na atividade de vasorelaxamento, modulam o metabolismo lipídico (Dell' Agli et al., 2004), reduzem os fatores de risco cardiovasculares como a elevação do colesterol LDL e da pressão sistólica (Estruch 2000). O vinho tinto tem poder de regular a expressão do gene da NOS nas células endoteliais que aumenta a produção do NO (Gorinstein et al., 2004). O NO^{*} tem também a função de controlar a expressão de genes envolvidos na aterogênese (Wallerath & Poleo, 2003). Os componentes polifenólicos da uva são potentes vasodilatadores pela estimulação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (Ndiaye et al., 2003). Vários processos foram mostrados em modelos animais com o uso dos polifenóis do vinho como a modulação da pressão sanguínea, inibição da migração e proliferação das células do músculo liso e inibição da agregação plaquetária (Figura 1.8) (Dell Agli et al., 2004).

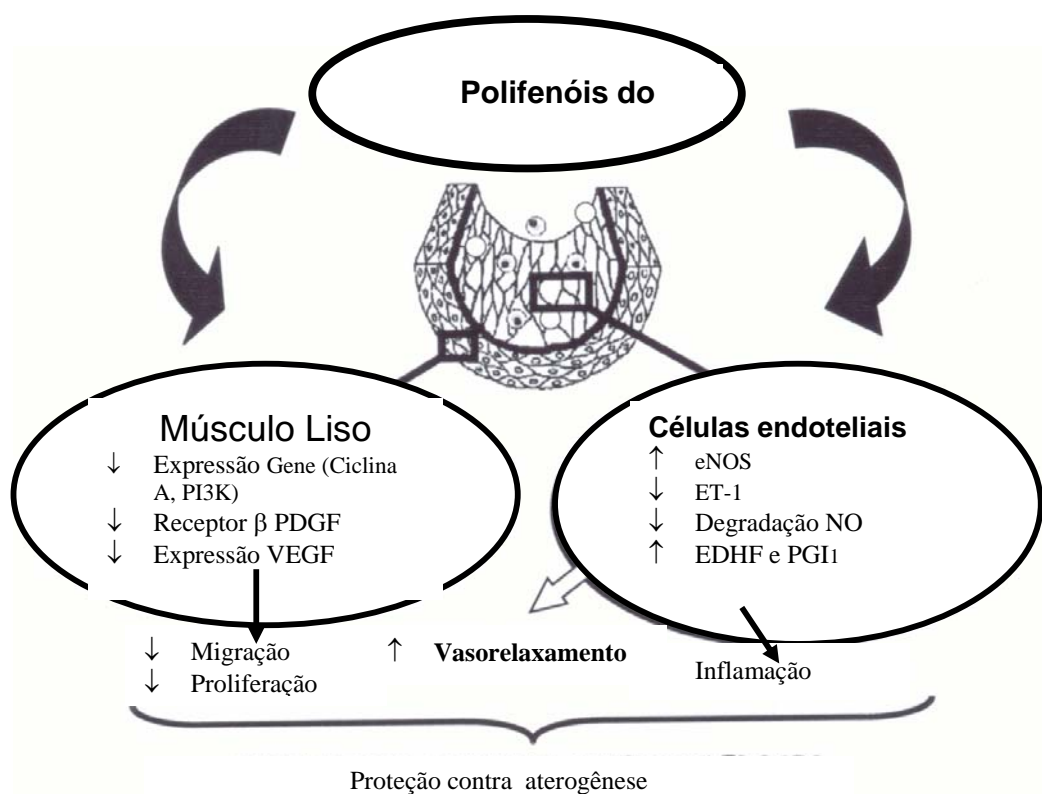


Figura 1.8. Efeitos protetores dos polifenóis do vinho na parede arterial. (Adaptado Dell'Agli et al., 2004).

PDGF – Fator crescimento derivado plaquetário

VEGF – Fator crescimento endotélio vascular

PI3K – Fosfatidilinositol 3 Quinase

eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial

EDHF – Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

ET1 –Endotelina 1

PGI1 - Prostaciclina 1

NO - Óxido nítrico

A utilização *in vitro* de quercitina e ácido tanínico, polifenólicos presentes na uva, produziu vasorelaxamento dependente do endotélio, enquanto que na artéria onde o endotélio foi removido não foram observados os mesmos efeitos

(Fitzpatrick et al., 1993). Um importante polifenol é o resveratrol, que é encontrado em 72 espécies de plantas, sendo que é mais abundante na uva preta (Tyler Varro, 1997). Sua concentração encontra-se principalmente elevada na casca e sementes da uva. Pelo fato do resveratrol ter propriedades estrogênicas (fitoestrógeno) participa dos efeitos benéficos de proteção cardiovascular (Broiher, 1999). O suco de uva preta aumenta a capacidade antioxidante total do plasma e protege a LDL da oxidação; estes efeitos são similares aos produzidos pelo vinho tinto (Day et al., 1997). Um estudo realizado na Inglaterra sobre a agregação plaquetária em mulheres, observou que o vinho tinto ou suco de uva apresentavam os mesmos efeitos na redução da agregação plaquetária, enquanto que o grupo tratado com vinho branco não apresentava esta proteção (Heather et al., 1995). Em outro estudo realizado por Demrow e colaboradores (1995) em modelo animal no qual relacionou o vinho tinto, vinho branco e suco de uva preta quanto a atividade de adesão plaquetária e formação trombótica constatou que o vinho tinto e suco de uva eram efetivos quanto a prevenção enquanto o vinho branco não produzia tal efeito. Os resultados foram atribuídos aos polifenóis por estarem presentes principalmente nas uvas com cor vermelha. O consumo de suco de uva tem sido relacionado com decréscimo de risco de trombozes coronarianas e infarto do miocárdio, quando comparado aos sucos de laranja e grapefruit (Keevil et al., 2000). Os flavonóides inibem a produção de tromboxana A_2 , talvez por inibirem a atividade da ciclooxigenase (Heather et al., 1995).

Assim, diversos estudos descritos sugerem que as propriedades antioxidantes do suco de uva e vinho tinto têm sido identificadas na prevenção de danos oxidativos e nas doenças cardiovasculares.

1.10 Hipótese

O presente projeto de estudo foi elaborado com a intenção de testar a hipótese de que os animais submetidos à ingestão de suco de uva preta e de vinho tinto Cabernet Franc melhoram o quadro de hipertrofia compensada e insuficiência cardíaca direita induzidos por monocrotalina, através da modulação do dano oxidativo.

1.11 Objetivo

1.11.1 Objetivo Geral

Este estudo teve por verificar a ação antioxidante *in vitro* do suco de uva preta e vinho tinto Cabernet Franc, assim como seu efeito *in vivo* num modelo experimental de hipertrofia cardíaca direita induzida pela monocrotalina.

1.11.2 Objetivos Específicos

Estudos *in vitro*:

- a) medir a capacidade antioxidante total (TRAP) no suco e vinho tinto;
- b) medir a reatividade antioxidante total (TAR) no suco e vinho tinto;
- c) medir a produção de ânion superóxido pela xantina oxidase no suco e no vinho tinto.

Estudos *in vivo*:

- a) avaliar os parâmetros de crescimento e ingestão das dietas pelos animais submetidos ao tratamento;
- b) observar a aparência geral dos animais e quantificar o índice de mortalidade;
- c) averiguar o grau de congestão dos pulmões e fígado;

- d) quantificar o grau de hipertrofia ventricular direita, esquerda e cardíaca;
- e) averiguar o perfil hemodinâmico, através das medidas de pressão ventricular sistólica e diastólica final do ventrículo direito e suas respectivas derivadas;
- f) analisar a lipoperoxidação em tecido cardíaco, através da técnica de quimiluminescência (QL);
- g) verificar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT), em tecido cardíaco;
- h) medir a capacidade antioxidante total no tecido cardíaco (TRAP);
- i) medir o nível de metabólitos do óxido nítrico no tecido cardíaco através de nitratos e nitritos (NO_3^- e NO_2^-).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

I. Análises *in Vitro*

2.1 Screening Fitoquímico Qualitativo

O Screening fitoquímico realizou-se no Laboratório de Química do Instituto de Química da UFRGS, mediante metodologia utilizada em todas as análises do Screening fitoquímico descrita por Martínez, M. (1996; 2001), com objetivo de se conhecer a composição qualitativa dos metabólitos secundários presentes nas matérias em estudo.

No extrato alcoólico vinho Casa Valduga. 1999. Vinho Fino. Tinto seco- Cabernet Franc Seculum. Nº 2369) e extrato aquoso *suco de uva 100% Natural. Qualidade casa Madeira. Fab. 12.1999*) foram realizados os testes fitoquímicos descritos:

Procedimentos:

Descrição dos testes realizados:

2.1.1.1 Ensaio de catequinas:

Para a realização do teste, com ajuda de um capilar, adicionou-se 1 gota do extrato alcoólico sobre o papel de filtro. Sobre a mancha produzida aplicou-se

uma solução de carbonato de sódio. A aparição de coloração verde na luz U.V. é indicativo de resultado positivo.

2.1.2 Ensaio de resinas:

Para detectar este tipo de composto, adicionou-se em 2ml da solução, 10ml de água destilada. A aparição de um precipitado, indica resultado positivo.

2.1.3 Ensaio de Fehling:

Permite identificar no extrato a presença de açúcares redutores. Para isso, se a alíquota do extrato não estiver em água, deve-se evaporar o solvente em banho-maria e o resíduo redissolver-se em 1-2ml de água destilada. Adicionou-se 2 ml do reativo de Fehling e aqueceu-se em banho- Maria por 5 – 10 minutos a mistura. Resultado: Positivo se a solução coloriu-se de vermelho ou ocorreu aparecimento de um precipitado vermelho.

2.1.4 Ensaio de Baljet:

Permite identificar a presença de compostos lactônicos, em particular cumarinas, mesmo que outros compostos lactônicos possam dar resultado positivo neste ensaio. Caso o extrato não seja alcóolico, deve-se evaporar o solvente em banho-Maria e redissolver-se na menor quantidade de álcool (1ml). Nestas condições adiciona-se 1ml de reativo de Baljet, considerado o ensaio positivo com a aparição de coloração ou precipitado vermelho (++ e +++), respectivamente.

2.1.5 Ensaio de Lieberman-Burchard:

Permite identificar triterpenos e/ou esteróis, baseando-se no fato de que ambos grupos possuem um anel androstano, geralmente insaturado no anel B e na posição 5-6. Para isso, se a alíquota do extrato não era clorofórmica, se evaporava o solvente em banho-Maria e o resíduo redissolvido em 1ml de clorofórmio. Adicionava-se 1 ml de anidrido acético e misturava-se bem, pelas paredes do tubo de ensaio. Adicionava-se 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado, sem agitar. Um resultado positivo era expresso por uma troca de coloração:

- 1-Rosa-Azul, muito rápido.
- 2-Verde intenso-visível, rápido.
- 3-Verde escuro Preto-escuro, final da reação

2.1.6 Ensaio de Espuma:

Permite identificar a presença de saponinas, tanto esteroidais como triterpênicas. Se a alíquota encontra-se em álcool, dilui-se 5 vezes de seu volume em água e agita-se a mistura vigorosamente por 5 – 10 minutos. Resultado Positivo se ocorrer o surgimento de uma espuma persistente por mais de 2 minutos, na superfície do líquido.

2.1.7 Ensaio Cloreto Férrico:

Permite identificar a presença de compostos fenólicos e/ou taninos em um extrato vegetal. Caso o extrato esteja em álcool, o ensaio determina tanto fenóis como taninos. A uma alíquota do extrato alcóolico adicionou-se 3 gotas de uma solução de tricloreto férrico 5% em uma solução salina fisiológica (cloreto de sódio

0,9% em água). Caso o extrato seja aquoso, o ensaio determina principalmente taninos. Na alíquota do extrato aquoso adicionou-se acetato de sódio para neutralizar e 3 gotas de uma solução de tricloreto férrico 5% em solução salina fisiológica. Resultado: Positivo- Desenvolvimento de coloração vermelho-vinho, compostos fenólicos em geral; - Desenvolvimento de coloração verde intensa taninos do tipo Pirocatéquicos; - Desenvolvimento de coloração azul, taninos do tipo pirogálhicos.

2.1.8 Ensaio de Borntraeger:

Permite a identificação de quinonas. Para isso se a alíquota do extrato não for clorofórmica, deve-se evaporar o solvente em banho-Maria e o resíduo dissolver em 1ml de clorofórmio. Adicionava-se 1 ml de hidróxido de sódio 5% em água. Agitava-se misturando as fases e deixava-se em repouso até a separação das fases. Resultado: fase aquosa alcalina superior adquire coloração rosada (++) ou vermelha (+++).

2.1.9 Ensaio de Shinoda:

Permite identificar flavonóides em um extrato vegetal, utilizando um extrato alcóolico. Diluía-se com 1ml de ácido clorídrico concentrado e uma lasca de magnésio metálico. Depois do início da reação, esperava-se 5 minutos, adicionava-se 1ml de álcool amílico, misturava-se as fases e deixava-se repousar até a separação das fases. Se a alíquota do extrato misturava-se à água, procedia-se da mesma maneira, a partir da adição do ácido clorídrico concentrado. Resultado: Positivo, quando o álcool amílico coloria-se de amarelo, laranja, avermelhado ou vermelho, intenso em ambos os casos.

2.1.10 Ensaio de Kedde:

Permite identificar a presença de glicosídeos cardiotônicos num extrato, utilizando uma alíquota do extrato alcóolico. Misturava-se com 1ml do reativo de Kedde e deixava-se repousar durante 5- 10 minutos. Resultado: Positivo quando ocorria desenvolvimento de coloração violácea, persistente durante 1-2h.

2.1.11 Ensaio de alcalóides:

2.1.11.1 Ensaio de Dragendorff:

Permite reconhecer em um extrato a presença de alcalóides. Para isso, se a alíquota do extrato estivesse dissolvida em solvente orgânico, este devia evaporar-se em banho-Maria, e o resíduo devia ser redissolvido em 1 ml de ácido clorídrico 1% em água. Caso o extrato fosse aquoso, na alíquota se adicionava-se 1 gota de ácido clorídrico concentrado (esquentava-se suavemente e deixava-se esfriar até acidez). Com a solução aquosa ácida realizava-se o ensaio adicionando-se 3 gotas do reativo de Dragendorff. Resultado: se o líquido tornava-se opaco(+), turvação bem definida(++) e precipitado(+++).

2.1.11.2 Ensaio de Mayer:

Procedia-se da mesma forma descrita, anteriormente, até a obtenção de uma solução ácida. Adicionava-se uma pitada de cloreto de sódio em pó, agitava-se e filtrava-se. Adicionava-se 2 ou 3 gotas de solução reativa de Mayer. Resultado: se o líquido tornava-se opaco(+), turvação bem definida(++) e precipitado(+++).

2.1.12 Testes específicos para Flavonóides

2.1.12.1 *Reação da Cionidina ou Shinoda:*

A técnica baseia-se na redução dos derivados flavônicos, de cor amarela, em antociânicos, vermelhos. O método não é comum de todos os flavonóides, as chalconas e isoflavonas não determinam o aparecimento desta cor.

Dissolvia-se o resíduo da solução extrativa em 5 ml de álcool 60° Juntava-se 1ml de ácido clorídrico e 0,1g de magnésio, cortado em pequenos fragmentos. Formava-se cor laranja (flavonas), vermelha (flavonóides) e violeta (flavononas).

2.1.12.1.1 *Reação oxalo-bórica:*

Reação para identificar flavonóis (fluorescência amarelo-esverdeada): as flavonas, flavononas e isoflavonas não acusam esta propriedade; os antocianosídeos e antocianóis que coram mais não produzem fluorescência amarelo-esverdeada.

2.1.12.1.2 *Reação com os hidróxidos alcalinos:*

Não é uma reação específica para um tipo de flavonóides, pois todos adquirem coloração amarelada. Dissolvia-se o resíduo em alguns mililitros de uma solução diluída de hidróxido de sódio: a solução adquiriria cor amarela.

2.1.12.1.3 *Reação com o cloreto férrico:*

Dissolvia-se o resíduo em alguns mililitros de álcool e juntava-se, depois, uma gota de solução aquosa de cloreto férrico a 4,5% formava-se cor verde

(flavonas e isoflavonas), verde castanho (flavonóis e flavanonas), amarela (chalconas).

Além destes testes preliminares realizou-se mais alguns testes específicos para flavonóides, segundo Costa, 1994 e Martinez, 2001, sendo estes:

Com meio alcalino, com ácido concentrado, reação de cianidina ou Shinoda, reação Oxalo-bórica, Cloreto férrico.

2.2 Capacidade Antioxidante Total (TRAP) *in vitro*

Nos alimentos existem substâncias bioativas com capacidade antioxidante. A concentração relativa destas espécies nos alimentos determina a capacidade antioxidante total dos mesmos. Se utiliza uma técnica quimiluminescente na qual se usa como iniciador da reação o 2,2-azo-bis (2-amidinopropano) dihidroclorato (ABAP). Este composto gera radicais peróxil por decomposição térmica espontânea. O peróxido de ABAP formado abstrai hidrogênios do luminol (5-amino-2,3-dehidro-1-4-ftalazinediona, que por sua vez forma um radical. As reações dos radicais peróxil são seguidas pela quimiluminescência induzida por luminol (5-amino-2,3-dehidro-1-4-ftalazinediona). Os radicais do luminol podem interagir com O_2 e H_2O_2 gerando um peróxido do luminol, que é empregado como fonte de quimiluminescência, mediada por radicais, uma vez que este composto emite intensa luminescência quando é oxidado por radicais livres na presença do oxigênio. Os antioxidantes presentes na amostra reagem com os radicais do luminol e fazem com que esta emissão fique reduzida até que todo o antioxidante tenha sido consumido. Para avaliar a quantidade relativa de antioxidante se determina o tempo de indução que se define como o tempo que leva para regenerar os radicais do luminol responsáveis pela emissão de luz, que coincide com o momento em que toda a carga de antioxidantes presentes na amostra foi consumida.

A determinação ocorre em um meio de reação constituído por ABAP(20mM) em tampão fosfato 50 mmol/L (pH=7,4), 40 μ mol/L de luminol em NaOH. A medida

se realiza em contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado. Se faz uma medida basal e logo se agregam alíquotas do alimento em estudo, registrando-se a emissão até voltar aos valores basais. Os resultados são expressos em $\mu\text{mol/L}$ de Trolox (Lissi et al.,1992).

2.3 Reatividade Antioxidante Total (TAR) *in vitro*

A TAR mede a qualidade de antioxidantes totais presentes na amostra em estudo. A relativa variabilidade destas espécies nos alimentos, determina a qualidade antioxidante dos mesmos. O fundamento do método é o mesmo do TRAP sua diferença está nas concentrações de AZO, luminol e amostras adicionadas, sendo que é medida a queda na emissão da luz, mostrando o quanto a amostra consegue neutralizar esta reação de quimiluminescente (Llesuy & Repetto, 2002).

2.4 Ensaio para Determinação da Xantina Oxidase (XO)

A atividade da XO foi determinada medindo a velocidade de formação de ácido úrico na seguinte reação: xantina 100 $\mu\text{mol/L}$ em tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,4, xantina oxidase 0,005U/250 μL . Foi avaliado o efeito de várias concentrações de suco e vinho na formação do ácido úrico. A reação se mediu a 295 nm, após 10 minutos de incubação a 25°C (Roback & Gryglewski, 1988).

II. Análises *in Vivo*

2.5 Animais

Foram utilizados, neste trabalho, ratos machos Wistar recém desmamados (21 dias de idade), pesando entre 35 a 40 gramas, adquiridos do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde foram colocados em caixas plásticas agrupados em 4 animais. Aos 24 dias de vida, os animais foram colocados em caixas plásticas individuais, com assoalho recoberto com serragem, quando deu-se início ao tratamento. Receberam ração e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos a um período de jejum das 11:00 h às 17:00 h quando foram administradas as bebidas. Nos demais horários tiveram livre acesso à ração (Guabi-Indústria de Alimentos Alisul Ltda). Foram mantidos sob ciclos de claro-escuro de 12 horas, com temperatura aproximada de 25°C, e umidade relativa de 70%.

Todos os procedimentos com os animais foram de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do grupo de Pesquisa e Pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Goldim e Raymundo, 1997).

2.6 Grupos Experimentais

Foram estabelecidos 6 grupos experimentais, sendo eles:

1. Grupo Controle → sem insuficiência cardíaca, que recebeu água durante todo o período do experimento.
2. Grupo Insuficiente → com insuficiência cardíaca por monocrotalina (MCT), que recebeu água durante todo o período do experimento.

3. Grupo Vinho → sem insuficiência cardíaca, que recebeu suco até 50 dias de idade e a partir de 51 dias, recebeu vinho tinto Cabernet Franc.
4. Grupo Vinho Insuficiente → com insuficiência cardíaca por MCT, que recebeu suco até 50 dias de idade e, após, recebeu vinho tinto Cabernet Franc.
5. Grupo Suco → sem insuficiência cardíaca, que recebeu suco durante todo o período experimental.
6. Grupo Suco Insuficiente → com insuficiência cardíaca por MCT, que recebeu suco durante todo o período experimental.

2.7 Protocolo Experimental

O início do tratamento se deu aos 24 dias de vida dos animais, e a indução da insuficiência cardíaca ocorreu no 49º dia (25 dias de tratamento). A indução da Insuficiência Cardíaca (IC) foi efetuada utilizando uma dose de 60 mg/kg peso de MCT (Mathew et al, 1995). Após, permaneceram por mais 3 semanas (21 dias) em tratamento, durante um período total de 46 dias. Todos os grupos experimentais se encerraram no 70º dia de vida dos animais (Figura 2.1).

Os animais aos quais foi administrado vinho, iniciaram o tratamento com suco na quantidade de 20 mL/Kg peso, devido à bebida ser isenta de álcool, e somente em idade mais avançada se introduziu o vinho na quantidade 15mL/kg peso (Keevill et al., 2000; Pataki et al., 2002). Ao final do período de tratamento, os animais foram caterizados para registro hemodinâmico (70º dia de vida) e, imediatamente após, foram mortos, por deslocamento cervical, para coleta e homogeneização de órgãos.

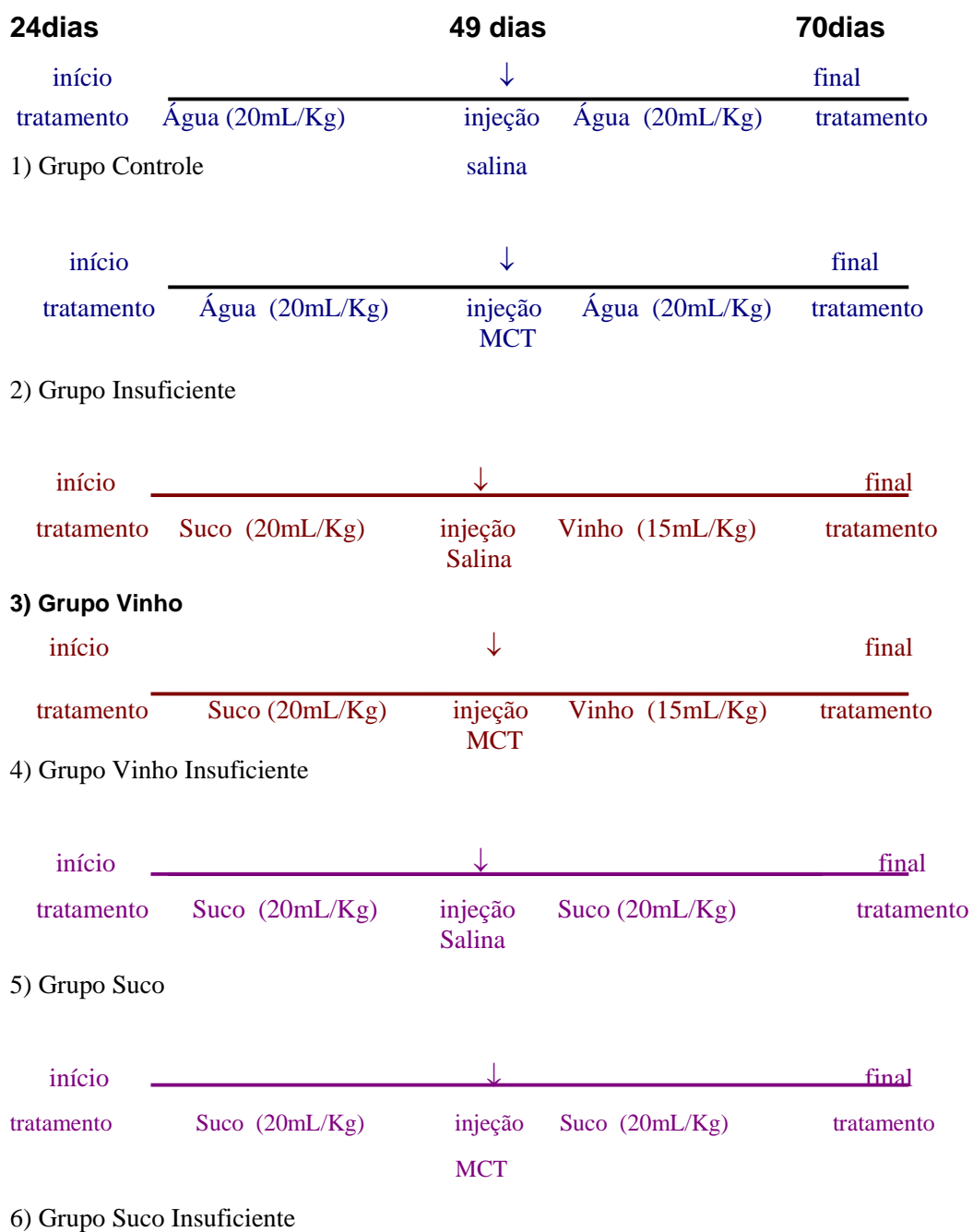


Figura 2.1: Protocolo de Tratamento dos Animais

2.8 Avaliação do Crescimento e Demais Parâmetros Nutricionais

Desde o início do tratamento, foi acompanhado o consumo alimentar e a curva de crescimento para monitorar a evolução dos animais. As medidas foram tomadas três vezes por semana onde cada animal foi pesado individualmente, porém é mostrado apenas uma medida/semana. O consumo foi avaliado pela quantidade oferecida e sua respectiva sobra na pesagem seguinte (Jong, 1998).

2.9 Indução da Insuficiência Cardíaca

Para indução de insuficiência cardíaca, que ocorreu aos 49 dias de idade, foi aplicada uma injeção intraperitoneal dose única para cada animal (60 mg/kg) da droga Monocrotalina (Crotaline – C240 SIGMA) diluída em 0,5 mL de HCl 1N, sendo adicionado 0,5 mL de HCl 0,1N, para ajustar o pH (7.4) e com NaOH 1N, o volume final foi complementado com solução salina (Chaper et al., 2000; Mathew et al., 1997).

Os animais dos grupos controle, vinho e suco receberam uma injeção com mesmo volume de solução salina nas mesmas condições e tempos experimentais.

2.10 Aparência Geral e Mortalidade dos Animais

Os animais nos quais foi induzida a Insuficiência Cardíaca Direita, por MCT, apresentavam sinais clínicos diferenciados dos que não receberam MCT, no entanto estes dados não foram medidos, apenas observados. Entre os sinais

observados foram pêlos, respiração, aparência do volume abdominal, cor das patas e focinho. A incidência de mortes durante o período experimental, após a indução da insuficiência cardíaca direita por MCT, também foi registrado.

2.11 Nível de Congestão Hepática e Pulmonar

Imediatamente após a morte dos animais, fígado e pulmão foram extraídos e pesados. Estes órgãos foram posteriormente submetidos a processo de secagem em estufa (65°C até peso constante) e novamente pesados. A congestão hepática e pulmonar foi avaliada a partir da razão do peso úmido/seco dos órgãos (Chaper et al., 2000).

2.12 Hipertrofia Cardíaca, Ventricular Direita e Esquerda

Após registro das pressões intraventriculares, os animais foram mortos com pancada na cabeça e deslocamento cervical. O tórax foi aberto com auxílio de uma tesoura e o coração foi rapidamente retirado e lavado por três vezes em KCl 1,15%. Após seco em papel filtro, obteve-se o peso total do músculo cardíaco. A hipertrofia cardíaca foi avaliada através da razão do peso do coração isolado pelo peso corporal e expressa em mg/g. Os átrios foram separados dos ventrículos, sendo os ventrículos direito e esquerdo, pesados separadamente. A hipertrofia direita foi avaliada pelo peso do ventrículo direito sobre peso corporal (mg/g) e, a hipertrofia esquerda foi avaliada pelo peso do ventrículo esquerdo sobre peso corporal (mg/g) (Chaper et al., 2000; Mathew et al., 1995).

2.13 Avaliação Hemodinâmica

Para avaliação de parâmetros hemodinâmicos, os animais foram anestesiados com ketamina (50 mg/Kg) e xilazina (20 mg/Kg) administradas intraperitonealmente. A veia jugular direita foi exposta e uma cânula (cateter de polietileno PE-50) foi introduzida e avançada até o átrio direito e o ventrículo direito. A pressão ventricular sistólica direita (PSVD) e a pressão ventricular diastólica final direita (PDFVD), as derivadas positiva (+dP/dt) e negativa (-dP/dt) foram monitoradas usando um transdutor de pressão (Strain-Gauge – Narco Biosystem Miniature Pulse Transducer RP-155, Houston, Texas, USA) ligado a um amplificador de sinais (pressure Amplifier HP 8805C). Os sinais analógicos de PA foram digitalizados (CODAS – Data Acquisition System, PC) com frequência de amostragem de 100 Hz (Chaper et al., 2000).

2.14 Morte dos Animais e Preparo dos Homogeneizados

Os animais foram mortos com pancada na cabeça e deslocamento cervical, imediatamente após o cateterismo. Posteriormente a morte dos animais, o coração foi rapidamente retirado e homogeneizado durante 30 segundos em ultra-Turrax, na presença de KCl 1,15% (5mL por g de tecido) e de fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100 mmol/L em isopropanol (10 μ L por mL de KCl adicionado). O PMSF é um inibidor de proteases e foi utilizado para que não houvesse degradação das enzimas cuja atividade foi medida. Os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24) e o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a -80 °C para realizar as medidas bioquímicas de estresse oxidativo (Llesuy et al., 1985).

2.15 Quantificação de Proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry (1951) e colaboradores, que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL. Para a realização das dosagens foram utilizados os seguintes reagentes:

- a) NaHCO_3 (bicarbonato de sódio) 2% em NaOH (hidróxido de sódio) 0,1N;
- b) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre) 1%;
- c) $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (tartarato de sódio e potássio) 2%

Foi preparada a fresco uma mistura utilizando-se 50 ml do reagente "a", 0,5 ml do "b" e 0,5 ml do "c".

Foram adicionados 20 μL de homogeneizado de tecido em 0,78 mL de água destilada e 2 mL do reativo descrito acima, aguardando-se 10 minutos. Após esse tempo, foi adicionado com agitação 0,2 mL do reativo de Folin Ciocalteau, diluído em água destilada na proporção 1:3. Após 30 minutos, a solução adquiriu coloração azulada que foi medida em espectrofotômetro marca Varian, modelo Cary a 625 nm.

O cálculo foi feito utilizando-se fator de correção, calculado a partir da curva de calibração construída utilizando-se solução padrão de albumina na concentração 1mg/mL.

2.16 MEDIDAS DE ESTRESSE OXIDATIVO

2.16.1 MEDIDAS DE LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO)

2.16.1.1 Quimiluminescência Iniciada por t-BOOH

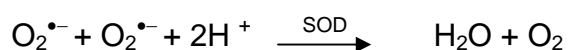
Este método consiste em adicionar um hidropéroxido orgânico de origem sintética, o hidropéroxido de tert-butil (t-BOOH), ao homogeneizado de tecido avaliando a capacidade de resposta produzida pela amostra. A realização deste tipo de teste consiste no fato de que os hidropéroxidos são espécies químicas bastante instáveis, reagindo com lipídios por um mecanismo radicalar, no qual gera produtos que emitem luz pela amostra em estudo. este método é um dos mais sensíveis para a medida de LPO.

A QL foi medida em um contador beta (LKB Rack Beta liquid scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizado o canal de trítio. As determinações foram realizadas em sala escura, em frascos de vidro mantidos na penumbra para evitar a fosforescência ativada pela luz fluorescente. O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistiu em 4mL de uma solução reguladora de KCl 140mmol/L, fosfatos 20mmol/L, pH 7,4 à qual foi adicionado 10 μ L de homogeneizado de tecido. Após, foi realizada uma leitura inicial, considerada esta a emissão de luz basal. O hidropéroxido orgânico utilizado foi o hidropéroxido de tert-butil, na concentração de 400mmol/L, do qual foram adicionados 30 μ L no meio da reação para uma concentração final de 3mmol/L. Foi medida, então, a emissão de luz e, dessa, foi descontada a emissão basal para fins de cálculos. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps) por miligrama de proteína (González-Flecha et al., 1991).

2.16.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

2.16.2.1 Superóxido Dismutase (SOD)

Esta enzima catalisa a reação de dois ânions superóxido, com a consequente formação de peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). A velocidade da reação catalisada pela SOD é 10^4 x maior do que a velocidade de dismutação espontânea em pH fisiológico (Southorn & Powis, 1988; Boveris et al., 1983). Reação 2.1.



Reação 2.1

A técnica utilizada neste trabalho para determinação da SOD baseou-se na inibição da reação do radical superóxido com pirogalol. O superóxido é gerado pela autooxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção, portanto quanto maior fosse a concentração de SOD na amostra, menor seria a auto-oxidação do pirogalol.

A oxidação do pirogalol, leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado (Marklund, 1985). Utilizou-se uma solução tampão (Tris-base na concentração de 50mmol/L; EDTA na concentração de 1mmol/L em pH 8,2), pirogalol 24mmol/L (em ácido clorídrico a 10mmol/L) e catalase a 30 μ mol/L. Foi realizada uma curva padrão com uma solução de SOD de concentração conhecida. Desta forma, calculou-se o fator de calibração necessário para converter a porcentagem de inibição da autooxidação em unidade de enzima. No ensaio, adicionou-se à cubeta 988 μ L de tampão tris, 4 μ L de catalase, zerou-se o espectrofotômetro e adicionou-se 8 μ L de pirogalol,

observando-se a oxidação do mesmo. Desta forma, obtivemos o máximo (100%) de oxidação desta substância. Com a amostra, procedeu-se da mesma forma, apenas com o ajuste de volume do tampão de acordo com a quantidade de homogeneizado de tecido adicionada, para se ter um volume final de 1mL. Os resultados foram expressos em U SOD/mg proteína.

2.16.2.2 Catalase (CAT)

Esta enzima é altamente específica e possui atividade apenas para peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos de metila e etila. A CAT é uma hemoproteína e catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio (Boveris & Chance, 1973).

A atividade da CAT é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, e obedece a uma cinética de pseudo primeira ordem. Sendo assim, a atividade de enzima catalase pode ser medida através da avaliação do consumo de peróxido de hidrogênio.

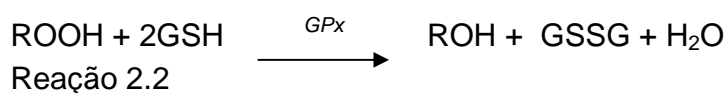
Este teste consiste em avaliar a diminuição da absorbância no comprimento de onda de 240nm, sendo esse o comprimento de onda onde há a maior absorção pelo peróxido de hidrogênio, utilizando-se cubetas de quartzo devido à alta energia no comprimento de onda no qual foram realizadas as medidas.

Para realização deste ensaio foram utilizados os seguintes reagentes: Solução tampão de fosfato de sódio a 50mmol/L (pH 7,4) e peróxido de hidrogênio 0,3mol/L. Em cubetas de quartzo, foram adicionados 955 μ L do tampão fosfato e 10 μ L de amostra de tecido ou 30 μ L de amostra de sangue, essa cubeta foi colocada em espectrofotômetro e descontada contra um branco de tampão fosfato. Após, foram adicionados 35 μ L do peróxido de hidrogênio e foi feito o monitoramento da diminuição da absorbância no comprimento de onda

selecionado. Os resultados foram expressos em nmoles por mg de proteína (Boveris & Chance, 1973).

2.16.2.3 Glutathione Peroxidase (GPx)

A enzima glutathione peroxidase (GPx) catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutathione reduzida (GSH) para formar glutathione oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido. Por isso, a sua atividade pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH, na presença de GSH e glutathione reductase (GR) na reação de redução acoplada à reação da GPx. A azida sódica (NaN₃) é adicionada para inibir a catalase (reação 2.2) (Wendel, 1981).



A amostra foi previamente preparada adicionando-se uma mistura de cianetos (cianetos de potássio KCN 9mmol/L e ferrocianeto de potássio K₃[Fe(CN)₆] (0,9mmol/L), para inibir a atividade pseudo-peroxidase da hemoglobina. Inicialmente, utilizou-se a mistura de cianetos para se obter o reativo de Drabkin, para medir a quantidade de hemoglobina. Depois de conhecida a concentração de hemoglobina, essas mesmas soluções foram utilizadas, em diferentes proporções, para se obter a solução transformante, que vai transformar toda hemoglobina em cianometahemoglobina.

SOLUÇÃO DE DRABKIN:

0,85mL de KCN 9 mmol/L;

6,6mL de K₃ [Fe(CN)₆] 0,9 mmol/L;

q.s.p. 10mL água destilada.

SOLUÇÃO TRANSFORMANTE:

- 5,0mL de KCN 9 mmol/L;
- 5,0mL de $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,9mmol/L

A atividade da GPx foi medida em um espectrofotômetro da marca Varian; modelo Cary. Foi monitorada a diminuição da absorbância do NADPH a 340 nm. Em um meio de reação contendo os seguintes reagentes:

- a) Solução tampão de fosfatos 143mmol/L e EDTA 1mmol/L, pH 7,5;
- b) NADPH 0,24mmol/L;
- c) azida sódica 1mmol/L;
- d) GSH 5mmol/L;
- e) Glutathione redutase (GR) 0,25U/mL;
- f) Hidroperóxido de tert-butil 0,5mmol/L.

Na cubeta do espectrofotômetro, foram adicionados 330 μ L de tampão, 50 μ L de homogeneizado de tecido, 500 μ L de NADPH, 10 μ L de azida sódica 50 μ L de GSH e 10 μ L de GR. A absorbância foi registrada por um período de aproximadamente 3 minutos, até haver uma certa estabilização da linha base. Após foram adicionados 50 μ L de hidroperóxido de tert-butil, e a diminuição da absorbância, devido ao consumo de NADPH, foi monitorada por aproximadamente 5 minutos. Os resultados foram expressos em nmoles por minuto por mg de proteína (Flohé & Gunzler, 1984).

2.16.3 Medida da Capacidade Antioxidante Total (TRAP)

Nos tecidos e outros fluidos corporais existem substâncias com capacidade antioxidante. A relativa concentração destas espécies no tecido determina a capacidade antioxidante total do mesmo. O fundamento desta medida está explicado no item 2.2, experimento *in vitro*.

A determinação ocorre em um meio de reação formado por ABAP (20mM) em tampão fosfato 50 mmol/L (pH=7,4), 40 μ mol/L de luminol em NaOH. A medida se realiza em contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado. Se faz uma medida basal e logo se agregam alíquotas do homogeneizado de tecido, registrando-se a emissão até voltar aos valores basais. Os resultados são expressos em μ M de Trolox/mg proteína (Lissi et al.,1992).

2.17 Determinação de Nitratos e Nitritos

Os níveis de nitratos e nitritos no tecido cardíaco foram medidos pela reação das amostras com o reagente de Griess. Alíquotas de 50 μ L foram incubadas com cofatores enzimáticos e nitrato redutase por trinta minutos em temperatura ambiente, para conversão de nitrato à nitrito. Os nitritos formados foram, então, analisados pela reação destes com o reagente de Griess. Forma-se um composto corado que foi medido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm e expresso em mmol/L (Granger, 1999).

A quantificação dos níveis de nitratos foi feita utilizando-se os seguintes reagentes. Reativo de Griess (1g de Sulfanilamina, 0,1g de naftiletlenodiamina, 2,3mL de ácido ortofosfórico 85%, 97,7mL de água); Tris 1mol/L, pH 7,5; NADPH 0,02mM; Glicose 6-fosfato (G6P) 5 mmol/L; Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) 10U/mL e Nitrato redutase (NR) 0,1U/mL. No meio de reação foram adicionados 50 μ L de amostra, 10 μ L de NADPH, 7 μ L de Tris, 23 μ L de uma mistura de G6P/G6PDH e 10 μ L de NR. A mistura foi incubada à temperatura ambiente, sob agitação, por 30 minutos. Após, foram adicionados 100 μ L do reagente de Griess, foi incubado, novamente, à temperatura ambiente sob agitação por mais 10 min e a absorbância foi lida à 540 nm. Os resultados foram avaliados comparando-se com uma curva padrão feita utilizando-se nitrato de sódio 1 mmol/L e expressos em mmol/L (Granger,1999).

2.18 Análise Estatística

Após efetuados todos os testes, foram calculadas as médias e os erros padrões das médias para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. Para análise estatística dos dados foi realizado o teste de análise de variância complementado com o teste de comparações múltiplas de Student-Newmann-Keuls, sendo as diferenças consideradas significativas para $p < 0,05$ (nível de significância de pelo menos, 5%).

3. RESULTADOS

I. Estudos *In Vitro*

3.1 Análise de Compostos Fitoquímicos Presentes no Vinho e Suco de Uva

Analisou-se a composição dos fitoquímicos do vinho e do suco de uva onde foram encontrados (Tabela 3.1). catequinas, lactonas, açúcares redutores, saponinas, taninos, fenóis geral, flavonóides, antocianidina. Os resultados mostram que no suco de uva os compostos de catequinas, saponinas, taninos, fenóis em geral, flavonóides, antocianidina estavam presentes, no entanto três componentes: lactonas, açúcares redutores e flavonóides não foram detectados nas amostras do produto (Tabela 3.1).

Tabela.3.1 **Análise de Fitoquímicos presentes no suco de uva e no vinho tinto**

Polifenóis	Vinho	Suco Uva
Catequinas	Presente	Presente
Lactonas	Presente	Ausente
Açúcares Redutores	Presente	Ausente
Saponinas	Presente	Presente
Taninos	Presente	Presente
Fenóis em Geral	Presente	Presente
Flavonóides	Presente	Presente
Antocianidina	Presente	Presente
Lavonóides	Presente	Ausente

O screening dos produtos permitiu identificar a presença dos fitoquímicos em cada produto.

3.2 Medida da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) no Vinho

A TRAP mede a quantidade de antioxidantes presentes na amostra. O vinho puro (100%) possui capacidade antioxidante total 54% superior ao ser relacionado com o vinho diluído a 50%. O mesmo se repete ao serem comparadas as diluições de 50% com 25% (Figura 3.1). Os resultados indicam a proporcionalidade da TRAP com as diluições.

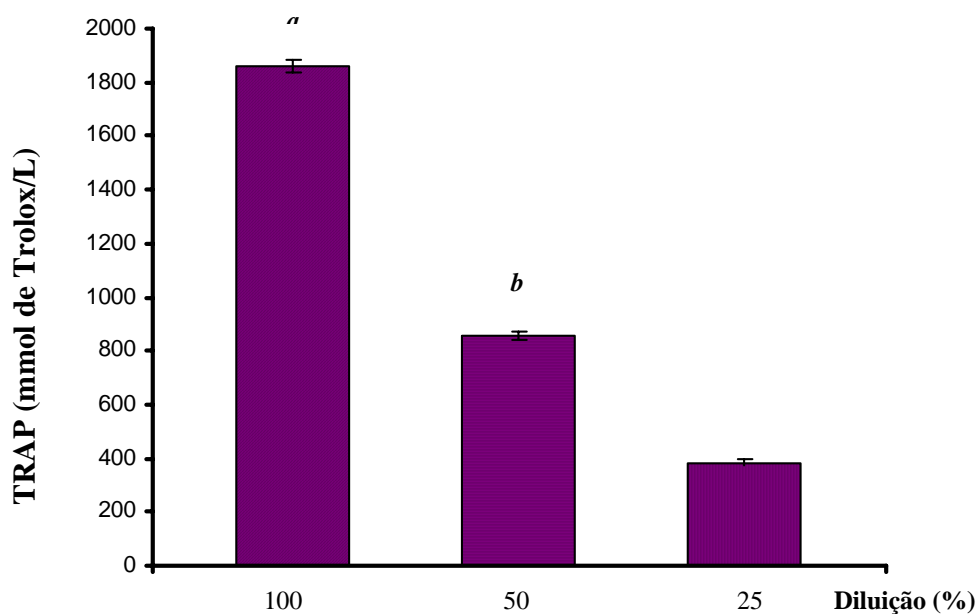


Figura 3.1: Capacidade antioxidante total (TRAP) (mmol de Trolox/L) *in vitro* no vinho a diferentes diluições.

Os resultados estão expressos como média \pm EPM. n = 10 repetições.

Utilizam-se as notações de significância:

a= diferença significativa em relação às outras diluições do vinho ($p < 0,001$).

b= diferença significativa em relação às amostras do vinho a 25% de diluição ($p < 0,001$).

3.3 Medida da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) no Suco de Uva

A quantidade de antioxidantes presentes na amostra do suco puro (100%) mostrou-se 37% superior ao suco diluído a 50%. Esta proporção foi aumentada a medida que o suco foi diluído, mostrando uma diferença significativa de 54% quando comparadas as diluições de 50% com 25% (Figura 3.2).

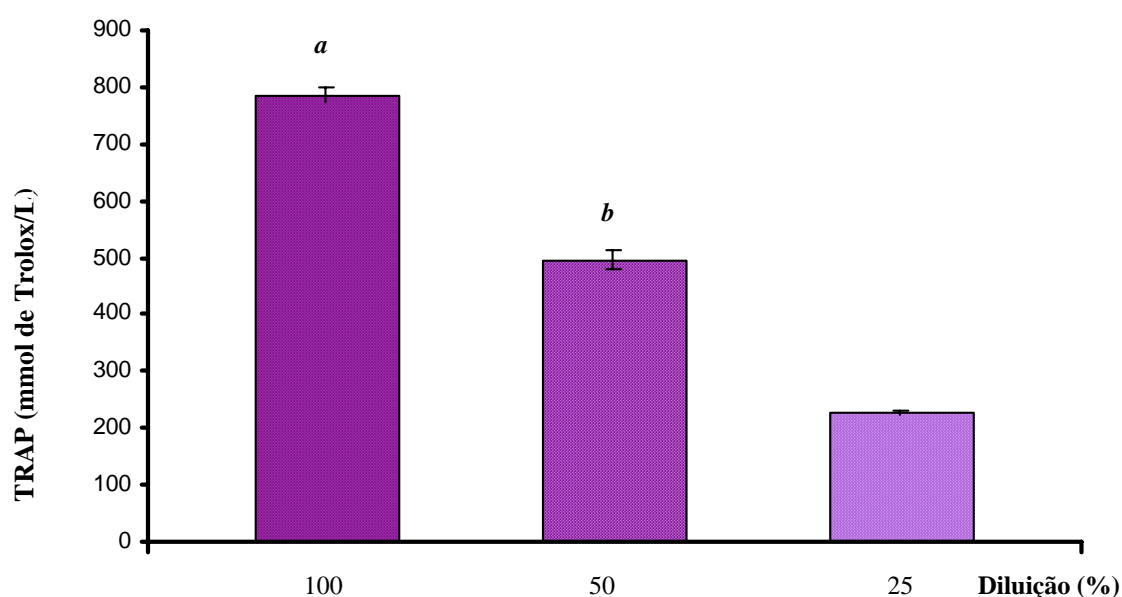


Figura 3.2: Determinação da capacidade antioxidante total (TRAP) em (mmol de Trolox/L) *in vitro* do suco de uva a diferentes diluições.

Os resultados estão expressos como média \pm EPM. n = 10 repetições.

Utilizam-se as notações de significância:

a= diferença significativa em relação às outras diluições ($p < 0,001$).

b= diferença significativa em relação às amostras do suco diluído a 25% ($p < 0,001$).

3.4 Medida da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) no Vinho e Suco de Uva

O vinho possui uma maior capacidade antioxidante total que o suco, sendo em média 50% maior que o suco em amostras puras de vinho. À medida que ocorre a diluição, esta diferença também vai sendo reduzida proporcionalmente (Figura 3.3).

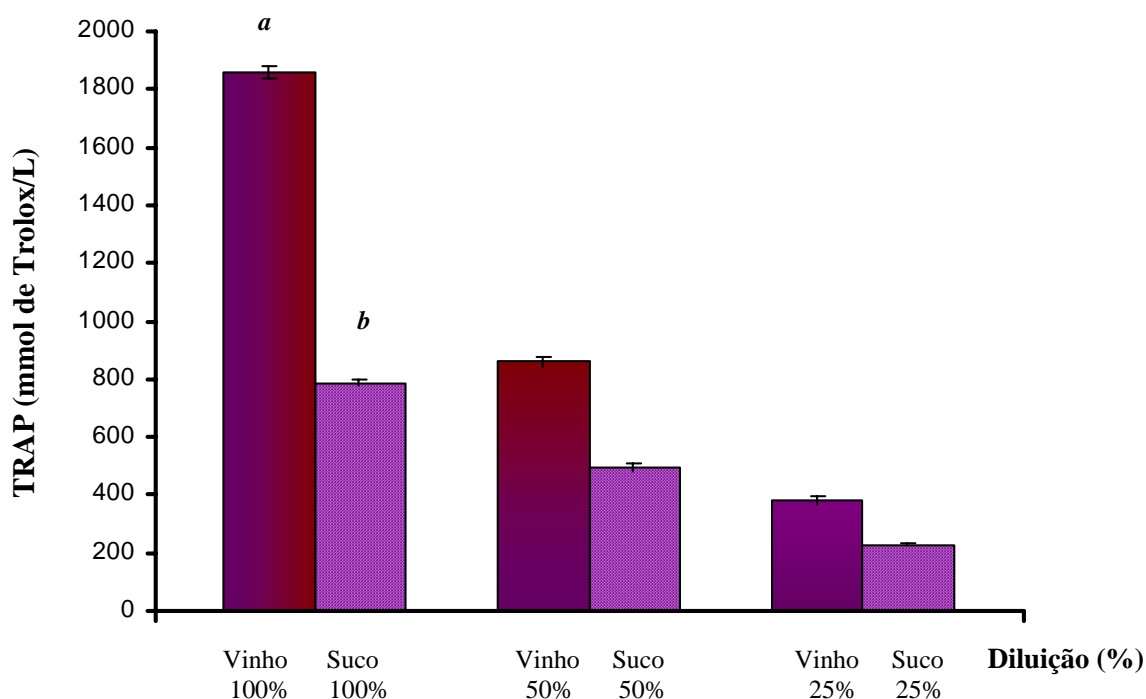


Figura 3.3: Determinação da Capacidade antioxidante total (TRAP) do vinho e suco de uva a diferentes diluições *in vitro* (mmol de Trolox/L).

Os resultados estão expressos como média \pm EPM. n = 10 repetições.

Utilizam-se as notações de significância:

a= diferença significativa em relação a todas as amostras ($p < 0,001$).

b= diferença significativa em relação às amostras do suco em todas diluições ($p < 0,001$).

3.5 Medida da Reatividade Antioxidante Total (TAR) do Vinho e do Suco de Uva

A reatividade antioxidante total mede a qualidade dos antioxidantes presentes nos alimentos. A TAR do vinho mostrou-se 19% superior quando comparada ao suco de uva (Figura 3.4).

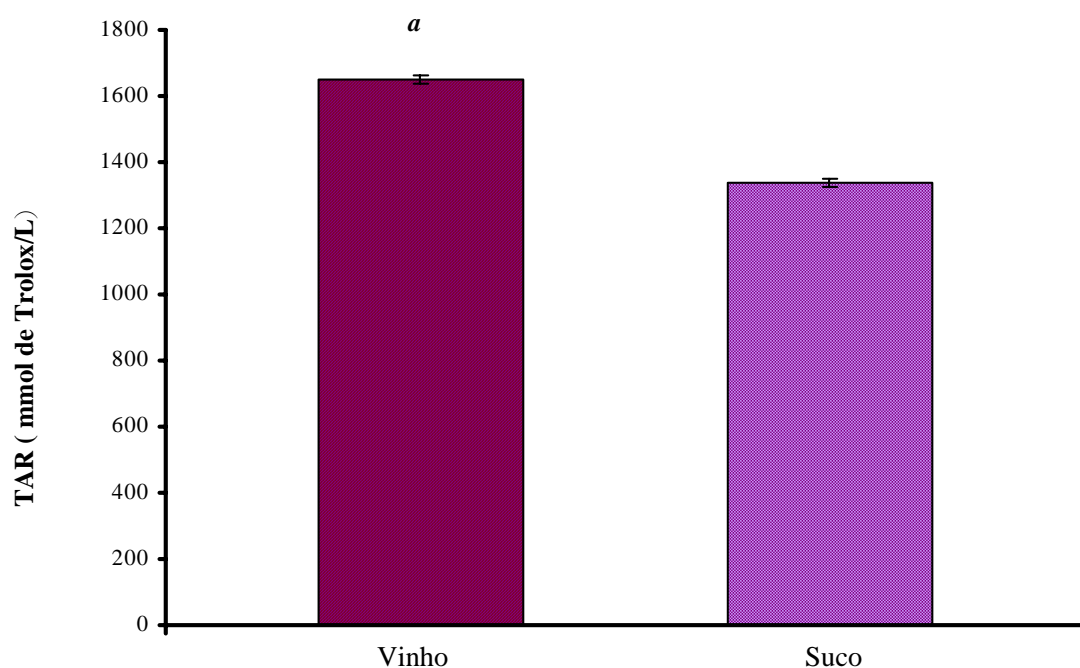


Figura 3.4: Determinação da reatividade antioxidante total (TAR) (mmol de Trolox/L) do vinho e suco *in vitro*.

Os resultados do vinho e suco de uva estão expressos como média \pm EPM, de 10 experimentos.

Utilizam-se as notações de significância:

a= diferença significativa em relação as amostras do suco ($p < 0,001$).

3.6 Xantina Oxidase *in Vitro*

Ao se analisar a atividade da xantina oxidase *in vitro* pode-se observar que o vinho consegue inibir em maior proporção a taxa de produção do ânion superóxido *in vitro* pelo sistema xantina-xantina oxidase ao ser comparado ao suco (Figura 3.5).

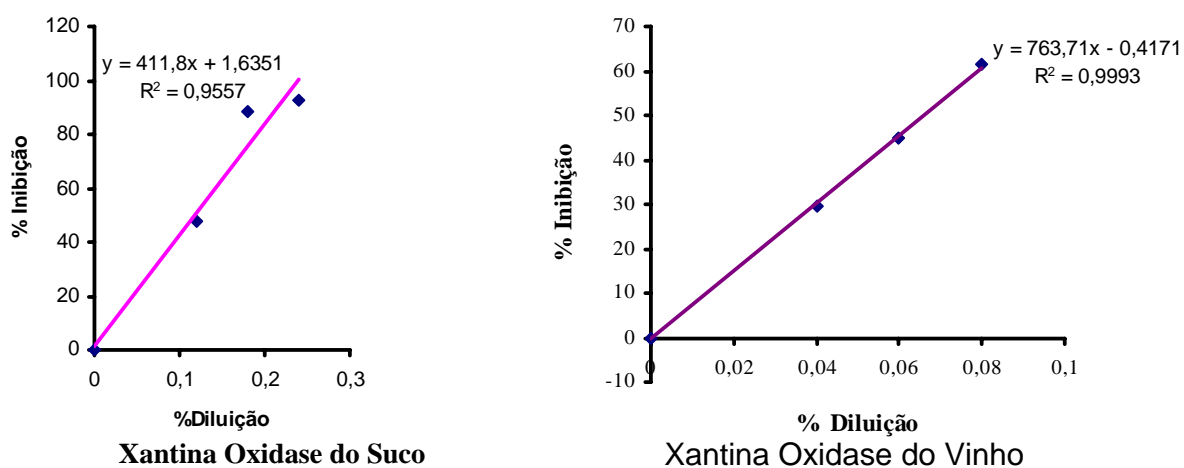


Figura 3.5: Determinação da Xantina Oxidase *in vitro* do Suco e Vinho (% inibição)

II. Estudos *In Vivo*

3.7 Avaliação Subjetiva Global e Mortalidade

Na avaliação subjetiva global, após duas semanas da administração da MCT, foram observados, nos animais com hipertrofia cardíaca direita, sinais como perda da massa muscular, dispnéia, patas e focinho cianóticos, pêlos quebradiços e amarelados, maior agressividade.

Registrou-se nos animais um índice de mortalidade geral, por diversas causas no GI um total de 20% ($p < 0,001$) sendo 61,5% superior em relação ao GVI que teve 7,7% de mortalidade, e o GI foi 65% maior em relação ao GSI que teve um índice de 7% de taxa de mortalidade.

3.8 Ganho de Peso dos Animais

O ganho de peso não apresentou variação significativa entre os grupos (Figura 3.6). A média de peso inicial variou de 46 a 52g e a final foi de 219 a 250g. Foi observada tendência de maior peso no grupo GS com uma média de peso final de 250g, e o grupo GI o menor com média final de 219g.

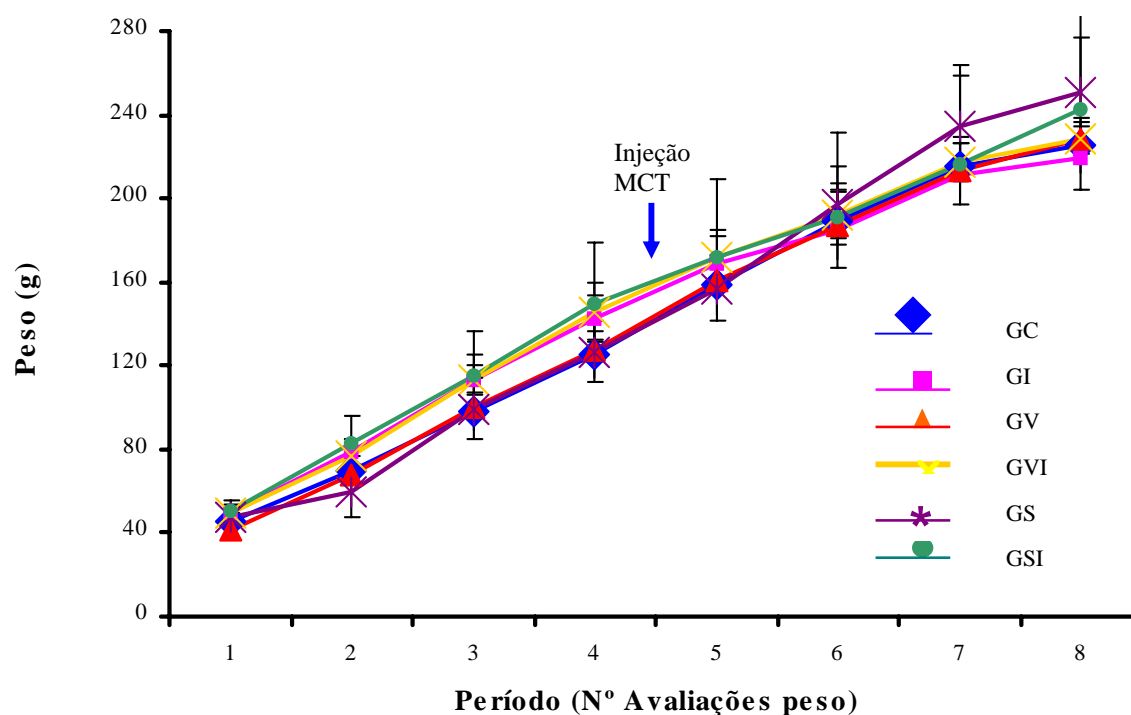


Figura 3.6: Ganho de peso (g) nos distintos grupos experimentais durante o período de tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm EPM de 8 a 12 animais por grupo.

3.9 Consumo Alimentar nos Distintos Grupos

Quanto ao consumo de ração durante o período experimental, não foi observada diferença estatisticamente significativa, apesar de haver uma tendência de 6% menor consumo no GI em relação ao GS que foi o de maior quantidade de consumo (Figura 3.7).

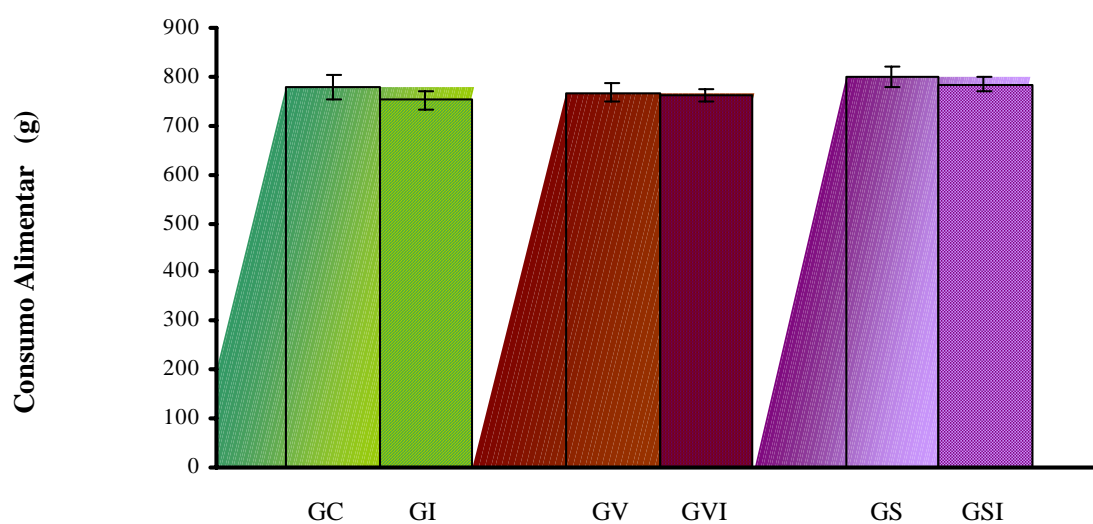


Figura 3.7 : Consumo alimentar (g) nos distintos grupos durante o período de tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm EPM de 8 a 12 animais por grupo.

3.10 Análise da Congestão de Órgãos

A congestão de órgãos foi avaliada pela razão peso úmido sobre peso seco dos mesmos. Quanto à congestão hepática não foi observada diferença significativa entre os distintos grupos. Enquanto na congestão pulmonar foi observada uma diferença significativa dos grupos GVI e GSI com seus respectivos controles. Ocorreu um aumento significativo do grupo GI em relação aos grupos GVI e GSI de 16,3% e 14,6%, respectivamente (Tabela 3.2). Quando comparados aos seus grupos controles, o GVI e GSI apresentaram diferença significativa

Tabela 3.2– Relação peso úmido/peso seco (em g/g) de pulmão e fígado nos distintos grupos durante o período de tratamento

Grupos	Relação Peso úmido/Peso seco	
	Fígado (g/g)	Pulmão (g/g)
GC	4,71 ± 0,06	5,67 ± 0,23
GI	4,88 ± 0,17	8,0 ± 0,27 ^a
GV	4,96 ± 0,02	5,86 ± 0,24
GVI	5,52 ± 0,47	7,20 ± 1,0 ^{a, b}
GS	4,57 ± 0,07	5,48 ± 0,19
GSI	4,64 ± 0,11	7,34 ± 0,27 ^{a, b}

Os resultados estão expressos como média ± EPM de 8 a 12 animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

a = diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado a seu respectivo grupo controle

b = diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo GI.

3.11 Análise de Parâmetros Morfométricos

Como esperado, a injeção de MCT induziu hipertrofia ventricular direita e não esquerda. Portanto a hipertrofia cardíaca observada se deve ao ventrículo direito (VD). O GI mostrou hipertrofia 31% superior ao ser comparado a seu controle (GC). Nos animais com administração da MCT tratados com suco mais vinho (GVI) a hipertrofia de VD diminuiu 23% em relação ao GI, no entanto o tratamento onde somente foi usado suco (GSI) não diminuiu significativamente a hipertrofia de VD. Entre GSI e GVI não ocorreu diferença significativa, apesar de haver uma tendência de redução em 12% do GVI em relação ao GSI (Tabela 3.3).

Quanto à hipertrofia ventricular esquerda, não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados.

A hipertrofia cardíaca ao se comparar os distintos grupos com seus controles o GVI foi maior em 13% ao ser comparado ao seu controle GV, os demais grupos não mostraram diferença.

Tabela 3.3– Parâmetros morfométricos nos distintos grupos durante o período de tratamento

Grupos	HVD	HVE	HC
	VD/Peso Corporal (mg/g) X 10	VE/Peso Corporal (mg/g)	Peso Coração/Peso Corporal (mg/g)
GC	6,3 ± 0,30	2,03 ± 0,60	3,10 ± 0,06
GI	9,1 ± 0,43 ^a	2,08 ± 0,33	3,42 ± 0,17
GV	5,6 ± 0,18	1,93 ± 0,32	2,84 ± 0,04
GVI	7,0 ± 0,55 ^{a,b}	2,15 ± 0,53	3,23 ± 0,12 ^a
GS	5,8 ± 0,27	2,14 ± 0,38	3,16 ± 0,06
GSI	7,9 ± 0,29 ^a	2,08 ± 0,88	3,36 ± 0,06

Os resultados estão expressos como média ± EPM de 8 a 12 animais por grupo.
HVD (Hipertrofia Ventricular Direita), HVE (Hipertrofia Ventricular Esquerda), HC (Hipertrofia Cardíaca).

Utilizam-se as notações de significância:

a = diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparado a seu controle

b = diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo GI.

3.12 Medidas Hemodinâmicas

Quanto à medida da pressão intraventricular sistólica direita (PSVD), ocorreu um aumento significativo de 52% do GI em relação ao seu controle (GC). Os grupos GVI e GSI tiveram um aumento de 39% e 37% respectivamente, em relação a seus controles (GV e GS). Relacionando os grupos GVI e GSI com GI, observou-se uma redução da PSVD de 28,5% e 23,8%, respectivamente (Tabela 3.4).

A medida da pressão diastólica final do ventrículo direito (PDFVD) apresentou um aumento significativo ($p < 0,01$) no GI em relação ao GC (Tabela 3.4). Nos grupos tratados foi registrada uma redução nos grupos GVI de 42% e no GSI 29% quando comparados ao GI (Tabela 3.4).

Quanto à velocidade de contração ventricular direita (+dP/dt) ocorreu variação significativa na contratilidade entre os grupos experimentais. O grupo GI mostrou diferença significativa de 47% superior ao seu controle (GC). Pode-se observar uma redução no grupo insuficiente tratado com vinho (GVI) de 30,7% quando comparado ao GI (Tabela 3.4). No GVI, a +dP/dt foi em 27% maior ao ser comparada ao seu controle (GV) e o GSI teve um aumento de 42% em relação ao GS.

A velocidade de relaxamento ventricular direita (-dP/dt) mostrou que o GI teve diferença significativa superior de 48% em relação ao seu controle (GC), o GVI foi 39% maior ao ser comparado ao seu controle (GV) e o GSI teve um aumento de 44% em relação ao GS. Observa-se uma tendência de estar elevada no GI em relação aos grupos GVI (25,4%) e GSI (22,3%) (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 - Medidas hemodinâmicas nos distintos grupos durante o período de tratamento

Grupos	PSVD (mm Hg)	PDFVD (mm Hg)	+dP/dt (mm Hg/s)	- dP/dt (mm Hg/s)
GC	28,5 ± 1,2	4,0 ± 0,4	962,8 ± 119,0	890,2 ± 91,0
GI	60,1 ± 2,7 ^a	8,9 ± 0,7 ^a	1816,3 ± 132,0 ^a	1709,5 ± 156,0 ^a
GV	26,2 ± 0,7	4,1 ± 0,4	914,8 ± 80,0	769,2 ± 60,0
GVI	43,0 ± 3,1 ^{a,b}	5,2 ± 0,5 ^b	1258,6 ± 145,0 ^{a,b}	1275,3 ± 94,0 ^a
GS	28,8 ± 2,0	4,1 ± 1,0	893,2 ± 125,0	736,0 ± 105,0
GSI	45,8 ± 3,7 ^{a,b}	6,3 ± 0,7 ^b	1547,2 ± 176,0 ^a	1328,3 ± 134,0 ^a

Os resultados estão expressos como média ± EPM de 8 a 12 animais por grupo
 PSVD = Pressão Sistólica VD; PDFVD= pressão Diastólica Final do VD; +dP/dt= índice de contratilidade; -
 dP/dt= índice de relaxamento.

Utilizam-se as notações de significância:

a = diferença significativa (p<0,001) quando comparado a seu respectivo controle

b = diferença significativa (p<0,01) em relação ao grupo GI

3.13 Medidas de Estresse Oxidativo (EO)

3.13.1 Medida de Lipoperoxidação por Quimiluminescência (QL)

Para os níveis de QL, a análise de variância demonstrou diferença significativa entre os grupos no tecido cardíaco. Foi constatado um aumento significativo de QL de 23% no GI em relação ao GC ($p < 0,01$). Nos grupos GVI e GSI não foi observada diferença significativa em relação aos seus respectivos controles (GV e GS). O grupo GVI apresentou uma redução significativa de 22% em relação ao GI, e o grupo GSI foi 72% inferior ao ser comparado ao GI ($p < 0,001$) (Figura 3.8). Constatou-se uma QL de 64% superior no grupo de GVI ($p < 0,001$) ao compararmos com o GSI (Figura 3.8). O grupo controle tratado com suco (GS) teve uma lipoperoxidação medida por QL, significativamente inferior em relação aos grupos controles GC e GV, (227% e 217% respectivamente).

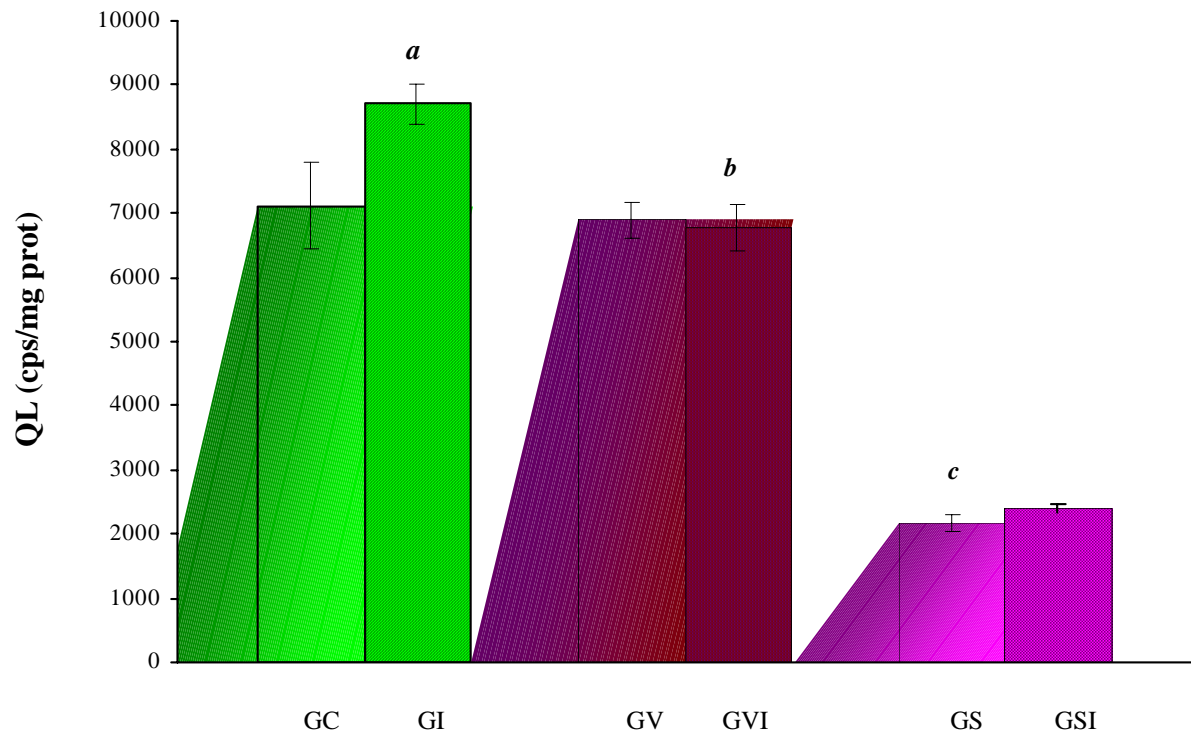


Figura 3.8: Quimiluminescência (QL em cps/mg prot) em homogeneizados de tecido cardíaco nos diferentes grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média \pm EPM de 8 a 12 animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

a - diferença significativa ($p < 0,001$) em relação aos demais grupos

b - diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo GSI.

c - diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo GC e GV.

3.13.2 Análise das Enzimas Antioxidantes

3.13.2.1 Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

Ao avaliar a atividade da enzima SOD em homogeneizado de tecido cardíaco, a análise de variância, demonstrou diferença significativa entre os grupos. Quanto ao GI foi observada uma redução de 82% da sua atividade em relação ao seu controle (GC). O GI mostrou uma tendência da enzima estar reduzida em 15% ao ser comparada ao grupo GVI. O grupo GSI mostrou uma atividade de 78% superior ao GI na atividade da SOD (Figura 3.9). Foi também, observada uma diminuição significativa de 35% na atividade da SOD no grupo GVI quando comparado com o GSI. A atividade da SOD não foi reduzida no GSI ao ser comparado ao seu grupo controle, enquanto no grupo GVI teve uma redução de 30% ao seu controle GV (Figura 3.9).

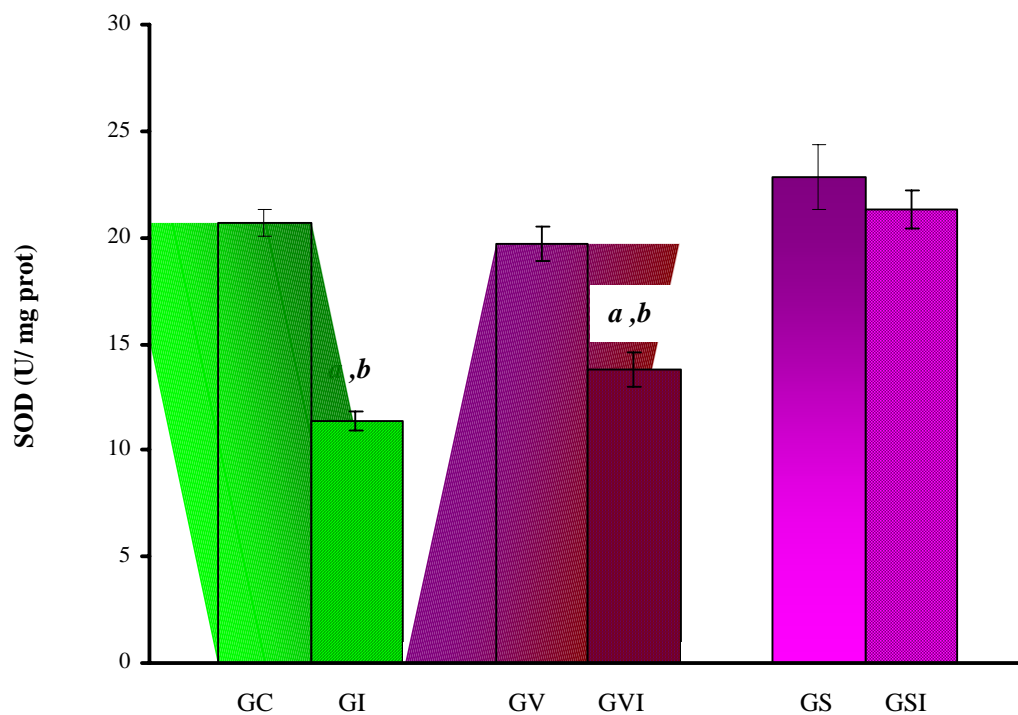


Figura 3.9 Medida da atividade da enzima Superóxido Dismutase (U SOD/mg proteína) em homogeneizados de tecido cardíaco nos diferentes grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média \pm EPM de 8 a 12 animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

a - diferença significativa ($p < 0,001$) em relação a seu grupo controle.

b - diferença significativa ($p < 0,001$) em relação a GSI.

3.13.2.2 Enzima Catalase (CAT)

Ao avaliarmos a atividade da enzima catalase em homogeneizados de tecido cardíaco, não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados, apesar de haver uma tendência de estar reduzida no GI em relação aos grupos GVI e GSI, (22% e 8%) respectivamente (Figura 3.10).

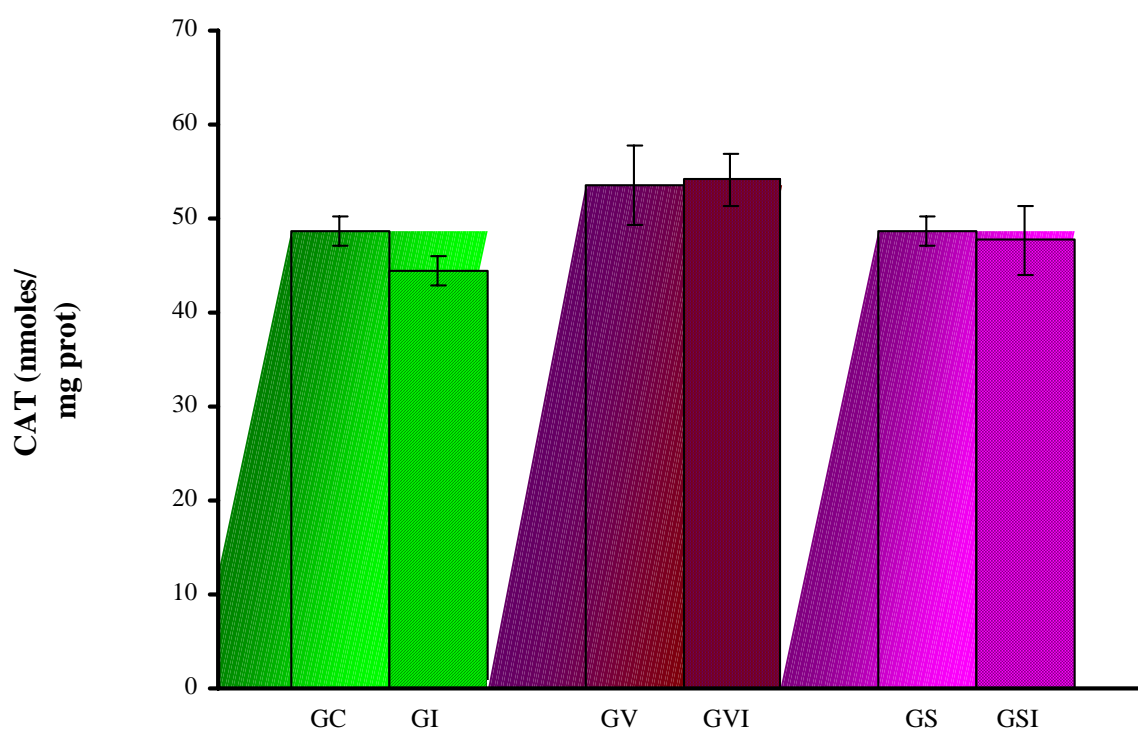


Figura 3.10: Medida da atividade da enzima catalase (nmoles/mg proteína) em homogeneizados de tecido cardíaco nos diferentes grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média \pm EPM de 8 a 12 animais por grupo.

3.13.2.3 Enzima Glutationa Peroxidase (GPx)

Ao avaliarmos a enzima GPx foi observada diferença significativa entre os grupos. Foi observada uma diminuição significativa da atividade da enzima em 33% ($p < 0,001$) no grupo GI ao ser comparado com o seu controle. Nos demais grupos esta diferença não se repetiu ao serem comparados aos seus respectivos controles. Nos grupos tratados observou-se um aumento significativo da atividade da GPx do grupo GVI em 47% ao ser comparado ao GI ($p < 0,001$), e esta também teve sua atividade superior em 35% no GSI em relação ao GI ($p < 0,001$) (Figura 3.11)

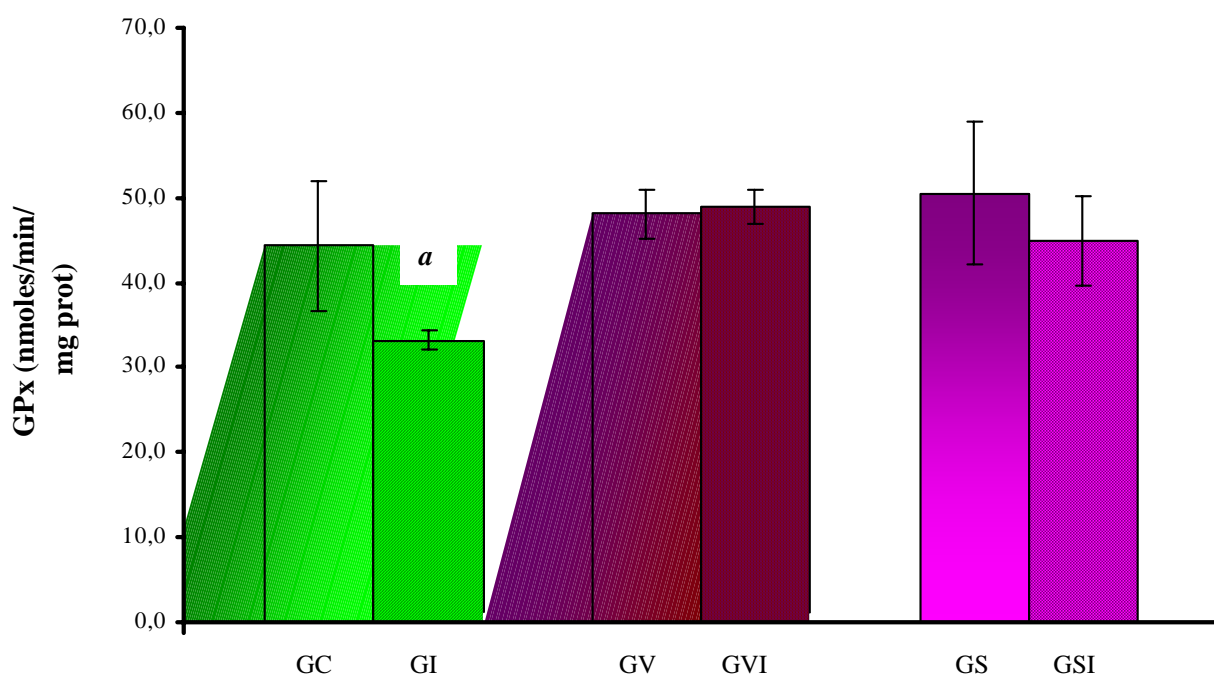


Figura 3.11: Medida da atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx) (nmol/min/mg proteína) em homogeneizados de tecido cardíaco nos diferentes grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média \pm EPM de 8 a 12 animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

a - diferença significativa ($p < 0,001$) em relação aos demais grupos.

3.14 Medida da Capacidade Antioxidante Total (TRAP)

A análise da TRAP em homogeneizado de tecido cardíaco mostrou diferença significativa do grupo insuficiente (GI) com 81% inferior em relação a seu controle (GC) ($p < 0.001$). Os grupos tratados GVI e GSI não tiveram diferença significativa em relação aos seus respectivos controles. A TRAP teve diferença significativa superior no GVI (58%) em relação ao GI ($p < 0.01$). Esta também mostrou-se maior no GSI (45%) ao ser comparado ao GI ($p < 0.01$) (Figura 3.12).

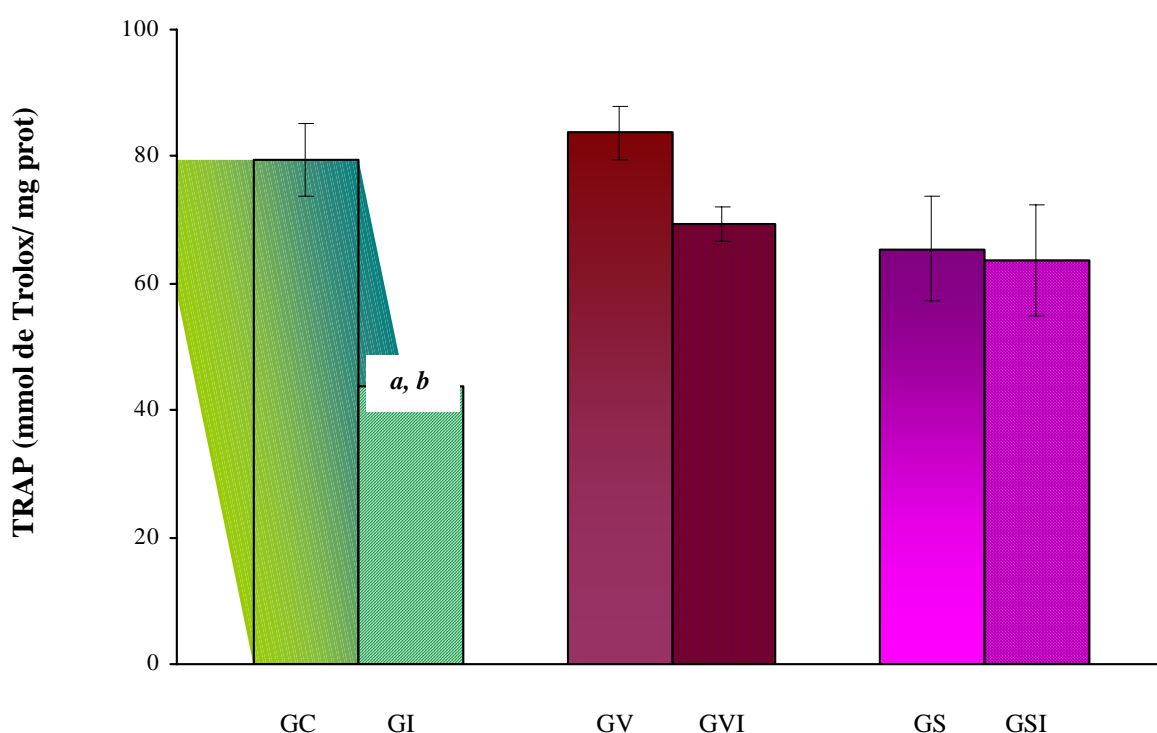


Figura 3.12: Medida da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) (mmol de Trolox/mg proteína) em homogeneizados de tecido cardíaco nos diferentes grupos experimentais.

Os resultados estão expressos como média \pm EPM de 8 a 12 animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

a - diferença significativa ($p < 0,001$) em relação a GC

b - diferença significativa ($p < 0,01$) em relação a GVI e GSI.

3.15 Avaliação da Concentração dos Metabólitos do Óxido Nítrico

3.15.1 Concentração de Nitrato (NO_3^-) em Tecido Cardíaco

A concentração de nitratos em tecido cardíaco apresentou uma variação significativa entre os grupos experimentais. Na figura 3.13, podemos observar uma diminuição significativa ($p < 0,001$) do grupo GI em relação a seu controle GC. Este efeito não foi observado nos grupos tratados com vinho (GVI) e suco (GSI). Estes dois últimos são 81% e 27%, respectivamente maiores que GI. Mas no GSI foi significativamente ($p < 0.01$) inferior (30%) ao ser comparado com GVI. O mesmo foi observado entre grupos controles com 34% ($p < 0.01$) inferior do GS em relação ao GV.

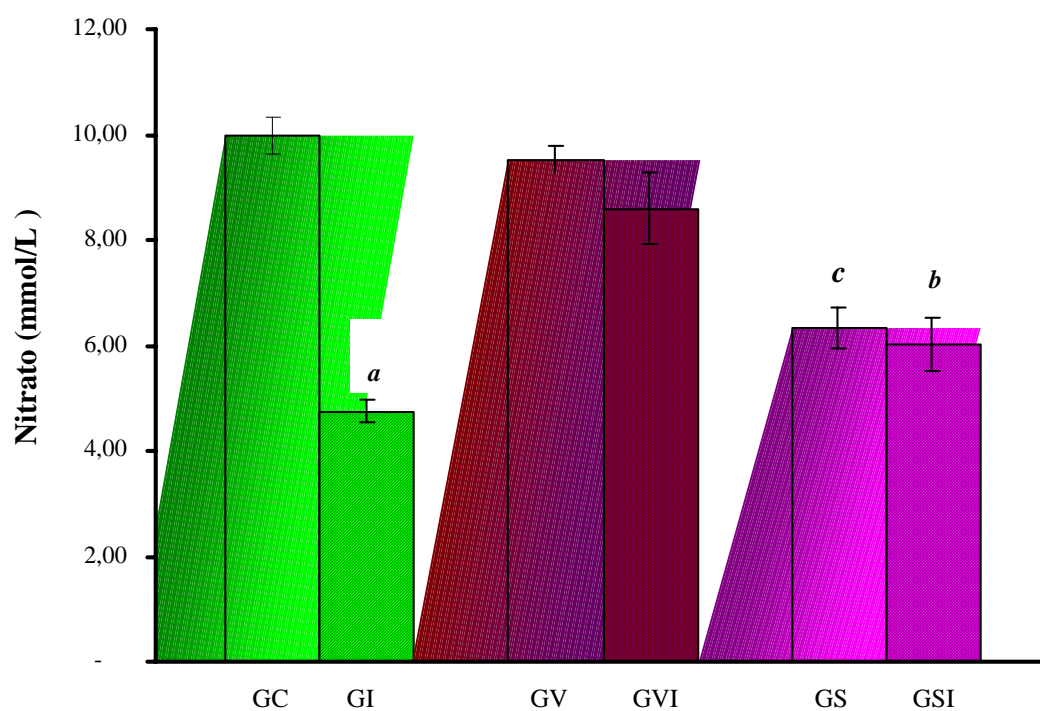


Figura 3.13: Concentração de Nitrato (NO_3^-) (mmol /L/) em homogeneizados de tecido cardíaco nos diferentes grupos experimentais.

Os resultados estão expressos como média \pm EPM de 8 a 12 animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

a - diferença significativa $p < 0,001$ em relação aos demais grupos.

b - diferença significativa $p < 0,01$ em relação ao grupo GVI.

c - diferença significativa $p < 0,001$ em relação ao grupo GC e GV.

3.15.2 Concentração de Nitrito (NO_2^-) em Tecido Cardíaco

A concentração de nitritos nos diferentes grupos experimentais apresentou variações de perfil semelhante a de nitratos. O grupo GI foi significativamente inferior em 37% ($p < 0,001$) quando comparado a seu grupo controle. O grupo GSI foi significativamente inferior em 41% ($p < 0,05$) em relação ao grupo GVI. O grupo GS mostrou-se menor ao ser comparado ao GV (57%) e GC (58%) (Figura 3.14).

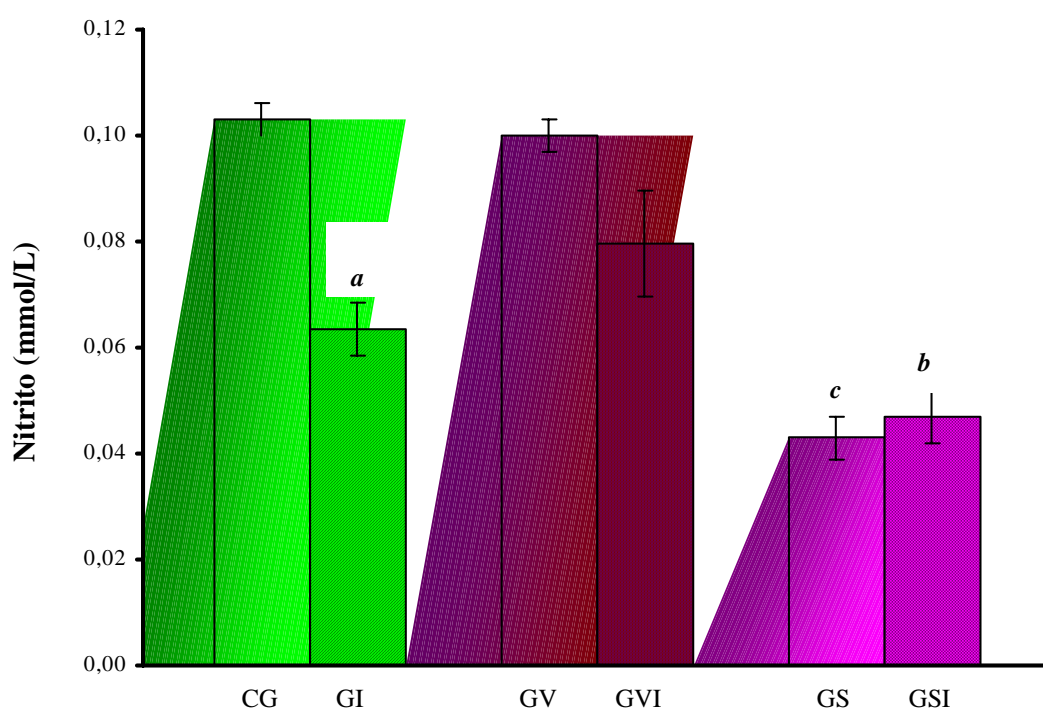


Figura 3.14: Concentração de Nitrito (NO_2^-) (mmol /L) em homogeneizados de tecido cardíaco nos diferentes grupos experimentais.

Os resultados estão expressos como média \pm EPM. de 8 a 12 animais por grupo.

Utilizam-se as notações de significância:

- a* - diferença significativa ($p < 0,001$) em relação a seu controle.
- b* - diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo GVI.
- c* - diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo GV e GC.

4. DISCUSSÃO

4.1 Estudos *In vitro*

As moléculas de polifenóis têm sido identificadas em uma ampla variedade de alimentos de origem vegetal. Estas moléculas são metabólitos secundários das plantas e não podem ser sintetizadas pelos humanos. Nas plantas, geralmente estão envolvidos na defesa contra a agressão da radiação ultravioleta e patógenos.

O vinho tinto, como o suco contém compostos polifenólicos, com mais de 200 substâncias, incluindo os flavonóides, os quais podem reduzir a agregação plaquetária e isto tem sido associado à baixa incidência das enfermidades cardiovasculares (Keevil et al., 2000).

Os flavonóides têm uma estrutura química básica como se observa na Figura 4.1.

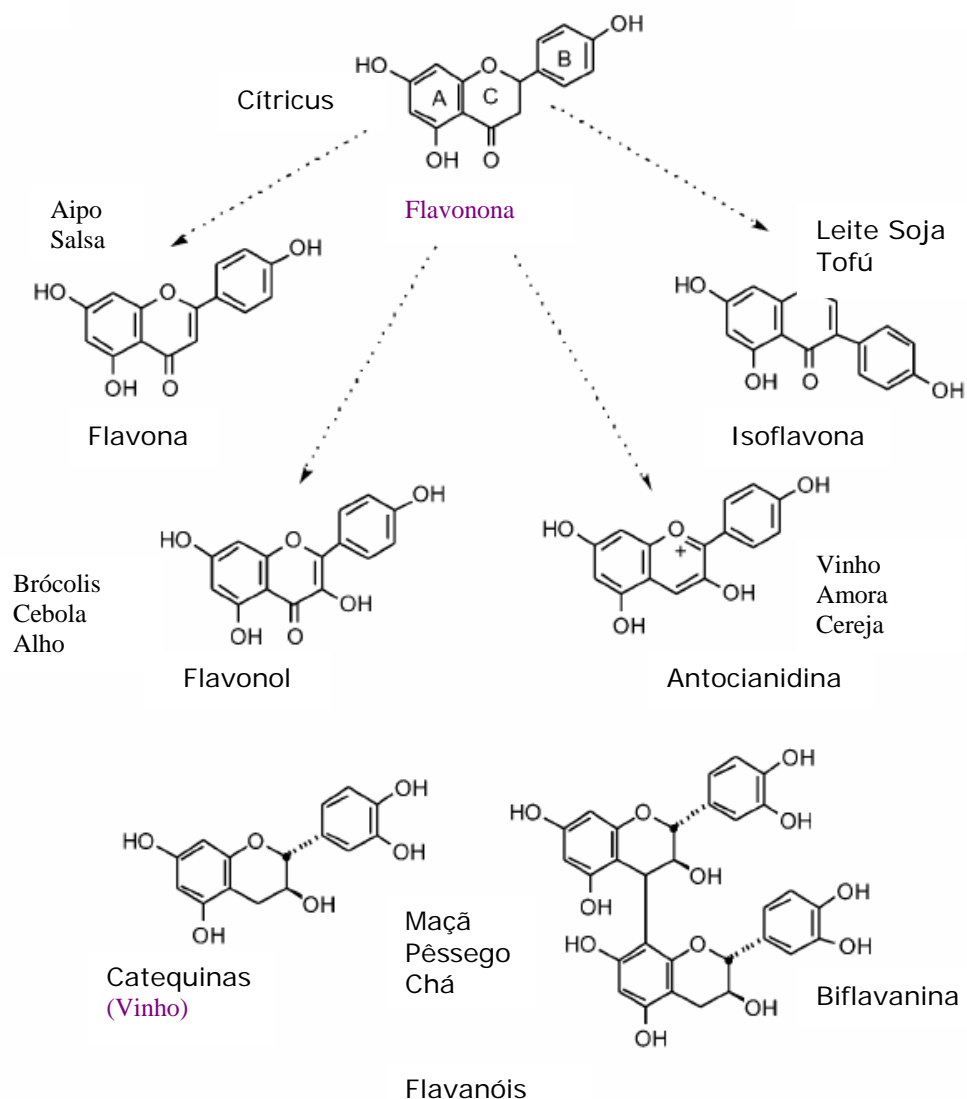


Figura 4.1 Estruturas dos distintos flavonóides (Adaptado Peterson & Dwyer, 1998).

Eles contêm múltiplos grupos hidroxilas (-OH). São antioxidantes por serem doadores de hidrogênio, “*quenchers*” de oxigênio singlet, potentes agentes quelantes de metais, podem atuar bloqueando as reações em cadeia da lipoperoxidação. (Shi et al, 2003).

Os flavonóides das uvas são primariamente flavonóis, antocianidinas e proantocianidinas, enquanto que no vinho os principais componentes são

catequinas. Os antioxidantes identificados no vinho tinto incluem ácidos fenólicos, flavonóis, catequinas monoméricas, antocianidinas poliméricas. A catequina é o componente no vinho que se apresenta em maior concentração: são encontrados em média 300mg/L. Os flavonóides estão presentes na concentração de 30mg/L (Quercitina e Kaempferol) e 140 mg/L de ácidos fenólicos (Penny et al., 2002). Todos estes componentes, incluindo o resveratrol, têm mostrado possuir propriedades antioxidantes *in vitro*. O resveratrol é um estilbeno presente principalmente na casca da uva, que confere propriedades cardioprotetoras associadas ao moderado consumo de vinho (Keevil et al., 2000; Penny et al., 2002).

Nos últimos anos, se tem efetuado o processo analítico de muitas bebidas para quantificar seu potencial antioxidante. Lugasi & Hovari (2003) ao analisaram variedades de sucos de frutas, cerveja, vinho branco e tinto observaram um poder antioxidante superior no vinho tinto em relação às demais bebidas. Durak e colaboradores (1999) ao avaliaram o vinho tinto, vinho branco e suco de uva preta, quanto à atividade antioxidante puderam observar que todos tinham um potencial antioxidante, sendo que o álcool isoladamente não mostrou esta propriedade.

A atividade antioxidante de extratos do suco de uva preta foi avaliada por Jayaprakasha e colaboradores (2001) pelo método do tiocianato (Yen & Hsieh, 1998), onde vários extratos mostraram 65-90% de atividade antioxidante.

Neste trabalho, foi avaliada a capacidade antioxidante total (TRAP) nos diferentes alimentos através do método de quimiluminescência que é um método extremamente sensível, como são todos os métodos luminescentes. Pode ser constada a diferença entre os mesmos, uma vez que a composição também foi distinta com uma maior capacidade antioxidante no vinho em relação ao suco. Ao se medir a qualidade total dos antioxidantes (TAR) no vinho e suco este dado se repetiu, mostrando sua eficácia quanto ao seu potencial antioxidante.

No nosso estudo, foram encontrados no suco e vinho várias subclasses de polifenóis, isto nos tem mostrado a variedade e não igualdade de substâncias bioativas presentes nestes alimentos, e das diferentes funções que possam proporcionar através destes compostos.

Outra determinação realizada para analisar a capacidade antioxidante destes compostos foi a medida a produção de ânion superóxido através da reação catalisada pela xantina oxidase. A adição de suco e vinho na reação produz uma inibição dependente da dose adicionada. Ambos compostos inibem a reação, no entanto o vinho foi utilizado em menores concentrações.

Em resumo, tanto o vinho como o suco mostraram ter uma boa capacidade antioxidante e também uma boa reatividade antioxidante, porém o vinho se destaca em relação ao suco.

4.2 Estudos *In vivo*

A grande maioria dos estudos disponíveis na literatura utilizam extratos de polifenóis e flavonóides isolados aplicados diretamente a vasos sanguíneos ou outras células isoladas (Fitzpatrick et al., 1993; Jayaprakasha et al., 2001; Ndiaye et al., 2003).

O presente estudo se propôs a reproduzir em ratos uma situação possível de ocorrer na prática alimentar em humanos. A proposta foi tentar proteger o tecido cardíaco, através de suplementação com componentes polifenólicos, desde o desmame, onde era oferecido o suco de uva e, após a vida adulta, era administrado o vinho tinto. Desta forma, se evitaram os efeitos deletérios do álcool durante o desenvolvimento e amadurecimento do animal. Após o período de 25 dias de tratamento preventivo com estes alimentos ricos em polifenóis, foi induzida a doença cardíaca, sendo que continuava-se o tratamento por mais 21 dias.

Foi utilizado o modelo da monocrotalina para induzir hipertrofia ventricular direita e insuficiência cardíaca direita.

A monocrotalina é metabolizada no fígado (Figura 4.2) via citocromo P450 a um composto ativo denominado dehidromonocrotalina (DHA). Este composto é transportado via glóbulos vermelhos ao pulmão, coração e rins (Mathew et al., 1997), causando lesões nestes órgãos (Soto-Blanco et al., 2001).

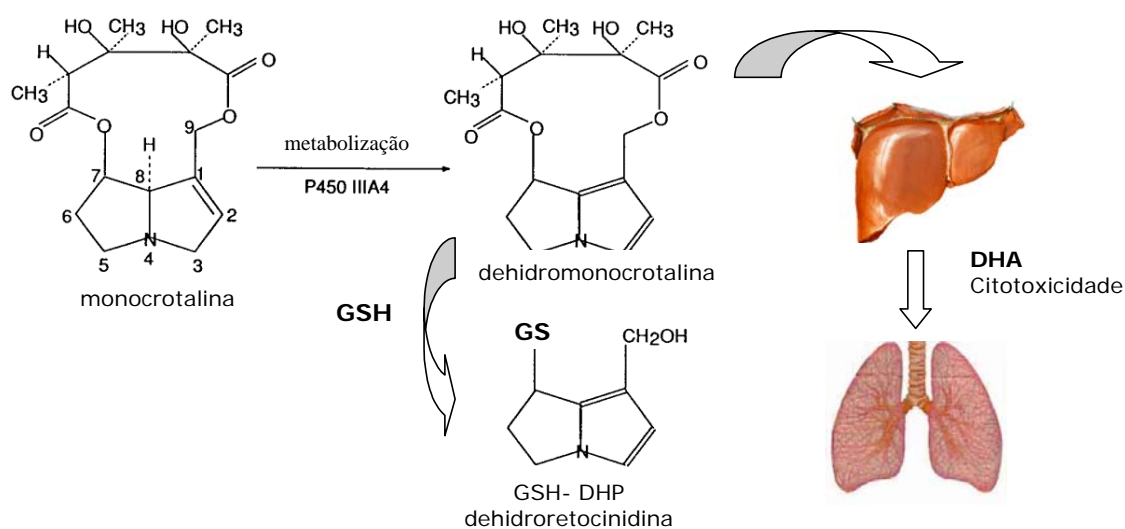


Figura 4.2: Metabolismo da Monocrotalina (Adaptado Taylor et al., 1997)

DHA = dehidromonocrotalina GSH = Glutaciona

GSH- DHP = dehidroretocinidina

A DHA tem a capacidade de se conjugar com a glutaciona (GSH) formando um metabólito pirrólico, a dehidroretocinidina (GSH-DHP) (Figura 4.2) que é solúvel em água e mais estável que a DHA (Wang et al., 2005). A GSH é uma substância com capacidade de detoxificar compostos, estabilizar reações intermediárias ou converter componentes tóxicos em produtos mais facilmente excretáveis (Wang et al., 2005). A administração da MCT induz lesões pulmonares com conseqüente elevação da pressão pulmonar. Podem ser observadas alterações histológicas tais como: espessamento medial dos vasos de resistência, espessamento subendotelial e fragmentação da lâmina elástica nas principais artérias pulmonares (Mathew et al., 1995). Lee et al., (2005) utilizando a dose de 60 mg/kg de MCT subcutaneamente, observaram, após 2 semanas de tratamento, hipertrofia muscular da camada média de artérias e arteríolas

pulmonares, sem alterações notáveis no parênquima pulmonar, veias pulmonares e bronquíolos. Após 5 semanas, os referidos autores observaram, além dos efeitos citados, espessamento dos septos alveolares com fibrose e infiltração de macrófagos no pulmão destes animais. O remodelamento estrutural ao nível de vasos pulmonares parece ser o principal fator contribuinte para o aumento da resistência vascular pulmonar, culminando com hipertensão pulmonar (Meyrick et al., 1980). Este fenômeno conduz a uma elevação da pós-carga do ventrículo direito, o que desencadeia o processo de hipertrofia ventricular direita, que progride para a insuficiência cardíaca (Farahmand et al., 2004).

Assim, o modelo de hipertensão pulmonar induzido pela MCT em ratos é um modelo não invasivo, reprodutível, de lento desenvolvimento, que mimetiza a síndrome da hipertensão pulmonar primária em humanos, podendo levar à hipertrofia de VD e eventualmente IC.

A hipertensão pulmonar está relacionada com a hipertrofia ventricular direita com subsequente alteração de estrutura e função. A este estado clínico, alterações de estrutura e função cardíaca devido à patologia pulmonar se denomina *Cor pulmonale*. Após uma semana da administração da MCT, os animais desenvolveram uma dificuldade respiratória, que foi se acentuando com a evolução do tempo. Na terceira semana, os animais apresentavam dispnéia, patas e focinho cianóticos. Além disso, os animais tratados com MCT mostraram um índice de mortalidade de cerca de 20% na 3th semana após a administração da droga. O tratamento com suco e suco mais vinho reduziu significativamente este índice (para cerca de 7%), indicando uma melhora no estado geral de saúde destes animais.

Nakazawa e colaboradores (1999) observaram uma depressão do peso nos animais aos quais haviam administrado 60 mg/Kg peso de MCT, após 21 dias. Farahmand et al., (2004) também utilizando 60 mg/kg de MCT, após 2 semanas,

não registraram perda de peso, mas com 6 semanas esta mudança foi significativa, em consequência dos efeitos tóxicos da droga.

Neste estudo não foi observada diferença significativa de peso entre os grupos, apesar haver uma tendência de redução no grupo GI e de aumento no GS. Como não houve diferença no consumo alimentar entre os grupos, a tendência à variação de peso deve ser resultado do estado de doença dos animais.

Como citado anteriormente, após 3 semanas de aplicação da MCT na dose de 60 mg/kg peso produz-se hipertensão pulmonar seguida de hipertrofia ventricular direita que leva a um remodelamento do músculo cardíaco (Pichardo et al., 1999 e Farahmand et al., 2004). Neste trabalho, ao avaliarmos os parâmetros morfométricos, após 21 dias da administração da MCT, no grupo que recebeu apenas água (GI), foi verificada HVD. Outro parâmetro, analisado foi a HVE que, neste grupo de animais (GI), não foram constatadas alterações. Este dado indica que a MCT não teve efeito sobre o ventrículo esquerdo, no entanto mostrou sua eficácia quanto à produção da HVD. Os resultados corroboram os achados da literatura que apontam para uma disfunção endotelial de vasos pulmonares com conseqüente aumento de pós-carga para o VD, estimulando o processo hipertrófico da câmara ventricular direita. Meyrick e colaboradores (1980), utilizando 60 mg/kg de MCT, observaram uma elevação de seis vezes na resistência vascular pulmonar em ratos, após 30 dias da injeção da MCT. Lee e colaboradores (2005) com o modelo da MCT (60 mg/kg peso), após 5 semanas da administração, avaliaram um aumento da expressão de fatores de crescimento tecidual pulmonar nos animais, e verificaram um aumento significativo da pressão sistólica ventricular direita e aumento do peso ventricular direito.

Nossos dados estão de acordo com diversos outros autores, utilizando o modelo da MCT para induzir insuficiência cardíaca direita, nos quais igualmente

não se observaram alterações de peso nos ventrículos esquerdos (Brunner, 1999; Farahmand et al., 2004).

No nosso trabalho, foi observada uma redução na HVD nos animais que receberam suco mais vinho e eram insuficientes (GVI) quando comparados aos animais que foram submetidos à indução da insuficiência cardíaca direita por MCT e que receberam água (GI). Nos animais que receberam apenas suco e foram tornados insuficientes (GSI) não foi observada a mesma proteção que nos animais com suco mais vinho, havendo apenas uma tendência à redução de HVD.

Landmesser e colaboradores (2002), em seu trabalho avaliando pacientes com hipertrofia cardíaca, demonstraram uma reduzida atividade da SOD extracelular associada a um aumento do estresse oxidativo que contribui para a disfunção endotelial nestes pacientes.

Em seus estudos, Giordano (2005), coloca que as EAON estariam relacionadas à sinalização intracelular para a hipertrofia cardíaca. Muitos fatores extracelulares são capazes de induzir a hipertrofia, e estes fatores podem ser ativados diretamente ou indiretamente pelas EAON. Uma vez que, como já discutido, o vinho tem uma maior capacidade e reatividade antioxidante total *in vitro*, poderia reduzir em maior escala a ativação da hipertrofia mediada por EAON. Adicionalmente, como a disfunção endotelial pulmonar parece ser a causa preponderante para o desencadeamento da hipertrofia de VD, a melhora desta disfunção poderia aliviar a hipertensão pulmonar, reduzindo o processo hipertrófico. Neste sentido, tem sido acumulada evidência para um papel vasodilatador para os polifenóis do vinho tinto por estímulo do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) em artérias coronárias (Ndiaye et al., 2003).

Os flavonóides do vinho tinto podem também diminuir a produção de ET-1, bloquear a expressão do NFK β e aumentar a produção de NO em células endoteliais (Luz & Coimbra, 2004).

Assim, o tratamento com vinho tinto poderia estar melhorando a disfunção endotelial pulmonar induzida pela MCT. O suco de uva tem também sido reconhecido como possível agente vasodilatador, porém menos efetivo do que o vinho tinto (Stein et al., 1999).

Pichardo e colaboradores (1999), ao avaliarem a hipertrofia cardíaca produzida com a administração de 50 mg /kg peso de MCT, por 3 semanas, não observaram alteração de peso no fígado e pulmão dos animais quando comparados aos controles. Contudo, Farahmand e colaboradores (2004), após 6 semanas da administração de MCT (60 mg/kg peso), puderam observar uma elevação da razão peso úmido/seco de pulmão e fígado nos animais com MCT quando comparados a seus controles.

Neste estudo, a MCT na dose de 60 mg/kg não induziu congestão hepática após 21 dias de tratamento. Estes resultados corroboram os achados do grupo do Dr. Singal. No entanto, em termos de congestão pulmonar nossos resultados diferem, uma vez que o grupo de animais tratados com MCT (GI) apresentou aumento neste parâmetro, que foi reduzido nos animais tratados com suco mais vinho e suco.

A insuficiência cardíaca é uma síndrome clínica caracterizada por redução de capacidade de enchimento ou ejeção ventricular que podem ser o resultado de alterações estruturais e funcionais.

No processo da insuficiência cardíaca uma das conseqüências é um aumento gradual da pressão diastólica final e diminuição da pressão sistólica ventricular final.

Pichardo e colaboradores (1999), utilizando a MCT (50 mg/Kg peso) por 3 semanas, observaram um aumento da pressão intraventricular sistólica e da diastólica final do ventrículo direito (PDFVD) e hipertrofia ventricular direita. Farahmand e colaboradores (2004) usando 60 mg/kg peso de MCT nos animais durante 2 e 6 semanas constataram que, após 2 semanas, a pressão intraventricular sistólica direita (PSVD) e pressão diastólica final do ventrículo direito (PDFVD) estavam aumentadas. Após 6 semanas, entretanto, a pressão intraventricular sistólica direita (PSVD) estava reduzida e a pressão diastólica final do ventrículo direito (PDFVD) progressivamente aumentava.

No nosso trabalho, constatamos no grupo que recebeu água e foi administrado MCT (GI), quando comparado a seu controle (GC), um aumento da PSVD. Isto se deve à elevação da pós-carga que por sua vez estimulou o processo hipertrófico levando ao aumento da força contrátil do ventrículo direito; esta fase é um estágio compensatório. Neste estudo, a velocidade de contração (+dP/dt) estava elevada, assim como a velocidade de relaxamento também foi reduzida (-dP/dt) nos animais tratados com MCT. Nos grupos insuficientes que receberam suco mais vinho (GVI) e somente suco (GSI) foi observada uma redução da PSVD e da PDFVD que pode ter sido resultado de melhora do processo de hipertensão pulmonar nestes grupos. Estes dados sugerem que ocorreu um aumento da biodisponibilidade do NO para aliviar a hipertensão pulmonar.

Brunner (1999) e Mathew et al., (1995) num modelo de estudo com injeção subcutânea de MCT (50 e 80 mg/kg, respectivamente) em ratos, constataram que, após uma semana da administração, não foram observadas alterações endógenas

no metabolismo do óxido nítrico (NO) e nos níveis de ET-1. Os vasos pulmonares estavam normais, não havia evidência de hipertensão pulmonar ou hipertrofia ventricular direita. Duas semanas após a administração da MCT, ocorreu uma deterioração da função endotelial, resultante da inibição da liberação de NO endotélio-dependente e elevação dos níveis de endotelina-1 (ET-1) nos vasos pulmonares.

Os polifenóis presentes no suco e vinho poderiam estar estimulando a síntese do NO melhorando a disfunção endotelial.

A indução da insuficiência cardíaca direita pela MCT produz o aumento das EAO como também uma diminuição dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. A diminuição dos antioxidantes permite que se aumentem os pró-oxidantes celulares, levando ao aumento da lipoperoxidação (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Vários trabalhos foram publicados com este modelo os quais se referem ao aumento de pró oxidantes. Entre eles, podemos citar o trabalho de Guarnieri e Muscari, em 1988, que haviam descrito que em homogeneizados de corações de ratos aos quais foi administrada MCT (21 dias, dose de 105 mg/kg peso) foi observado um aumento na produção do ânion superóxido e da concentração de malondialdeído. Pichardo e colaboradores (1999) mostraram que, na determinação de lipoperóxidos, os mesmos se encontravam significativamente aumentados (125%), em comparação com os animais controles, usando uma dose de MCT de 50 mg/kg. Em trabalho de 2004, Farahmand e colaboradores, observaram que ocorreu um aumento nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico na sexta semana de tratamento com MCT 60 mg/kg, não observando mudanças nas 2 primeiras semanas

Mathew e colaboradores em 2002, informaram que, quando se administra MCT, se observa que ocorre uma diminuição dos níveis dos tióis totais nos pulmões destes ratos, os quais apresentam hipertensão pulmonar.

Nosso trabalho coincide com as observações informadas pelos autores anteriormente citados. Neste trabalho, foi utilizada outra técnica para a determinação de lipoperóxidos, a quimiluminescência iniciada por hidroperóxido de tert-butil (Gonzalez et al., 1991).

Com os resultados observados poderíamos sugerir que a administração de MCT produz um aumento dos lipoperóxidos devido a sua metabolização hepática que conduz a uma diminuição da GSH e também de citocromo P450. Isto leva a produzir ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, gerando radical hidroxil que atacaria os lipídios das membranas produzindo esse dano.

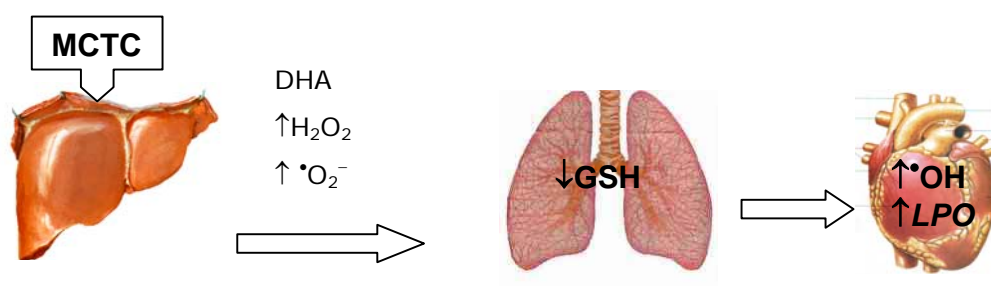


Figura 4.3 Lipoperoxidação (LPO) produzida pela MCT

Quando nós avaliamos a ação da administração de suco e vinho durante 45 dias, observamos que se produziu uma diminuição significativa dos níveis de lipoperoxidação cardíaca dos animais tratados com MCT. Os antioxidantes exógenos do suco e vinho poderiam atuar como doadores de hidrogênio, “*quencher*s” de oxigênio singlet e de ânion superóxido, que podem atuar na cadeia de reação de radicais livres na lipoperoxidação (Shi et al., 2003). No entanto, os animais não insuficientes do grupo suco comparados ao grupo que recebeu suco mais vinho mostraram níveis significativamente menores de oxidação dos lipídios.

Ao comparamos os grupos controles que receberam água com o grupo suco mais vinho não foi observada diferença. É importante destacar que os animais que receberam suco durante todo o período de crescimento, estavam protegidos contra os danos oxidativos produzidos pelo metabolismo. Isto é um dado novo não muito discutido na literatura que tem uma grande importância pois mostra o uso do suco com características que se assemelham a um alimento funcional.

As concentrações teciduais de radicais livres são limitadas pelos sistemas antioxidantes enzimático e não enzimático, que têm sido desenvolvidos e conservados com a evolução da vida aeróbia. Três são as enzimas de maior importância, entre elas: SOD, GPx e CAT. Muitas investigações têm se referido a alterações nas enzimas antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo nas doenças cardiovasculares.

Estudos indicam que, no estado de hipertrofia cardíaca, a atividade das enzimas antioxidantes inicialmente tem-se apresentado aumentada, e com o avançar do quadro da doença, as mesmas mostraram estarem reduzidas, associadas ao aumento do estresse oxidativo.

Em um estudo com pacientes portadores de insuficiência cardíaca, Keith e colaboradores (1998) mostraram uma redução da GPx. Hill & Singal (1996), em modelo de hipertrofia cardíaca, subsequente a infarto em ratos, mostrou que durante a fase de hipertrofia cardíaca ocorreu aumento da SOD e GPx; a CAT não estava alterada. No estado de insuficiência cardíaca, contudo, estes animais apresentavam a SOD levemente reduzida, a GPx e CAT mostravam uma progressiva redução. Em outro estudo, Ecartot-Laubriet e colaboradores 2003, estudaram as alterações na expressão das enzimas antioxidantes, posterior à indução da hipertrofia cardíaca direita (HCD) e consequente insuficiência cardíaca direita (ICD) pela MCT, onde observaram uma elevação da GPx e SOD; a CAT não apresentou alteração nesta fase. Ao serem

avaliadas na fase de insuficiência cardíaca direita, a GPx e SOD foram reduzidas e a CAT estava elevada.

Pichardo e colaboradores (1999), que trabalharam a ICD em resposta à sobrecarga de pressão, avaliaram as enzimas antioxidantes, e puderam observar que a GPx e SOD mostraram-se aumentadas na hipertrofia cardíaca e a CAT não teve alterações. No entanto, ao avaliar as enzimas na ICD a GPx e SOD tiveram sua atividade reduzida e a CAT aumentada. Farahmand e colaboradores em 2004, usando 60 mg/kg peso de MCT, investigaram as alterações antioxidantes em períodos de 2 e 6 semanas após injeção da MCT. Após duas semanas da administração da MCT, ocorreu um aumento da atividade da GPx e, em seis semanas foi observado um decréscimo, quando comparado aos animais do grupo controle. O mesmo se repetiu com a CAT. A atividade da SOD foi ligeiramente aumentada com duas semanas de uso da MCT.

Os nossos resultados mostram que, após o tratamento com MCT, ocorreu uma diminuição de 82% na atividade da SOD. A diminuição da SOD pode induzir a pensar que se deveria produzir um aumento do ânion superóxido nos homogeneizados dos corações de ratos tratados com MCT. Este radical poderia ser parte das espécies ativas de oxigênio que poderiam produzir oxidação das membranas nos cardiomiócitos.

Ao determinar os níveis da CAT não observamos alterações nos níveis da atividade desta enzima. Isto pode sugerir que o peróxido de hidrogênio não seja a principal EAO envolvida na toxicidade da MCT.

A GPx, é uma enzima que realiza a detoxificação de diferentes tipos de peróxidos que podem ser: lipoperóxidos e peróxido de hidrogênio. Nossos resultados indicam uma diminuição significativa de 33% nos níveis de GPx. Na revisão bibliográfica, observa-se que os níveis de GSH dos cardiomiócitos nos

animais tratados com MCT encontram-se diminuídos, e que este composto é substrato para a GPx. Como consequência, é muito provável que a concentração dos hidroperóxidos também se elevem por esta causa (Farahmand et al., 2004).

Os resultados obtidos por Farahmand e colaboradores (2004) mostram que na 6ª semana de tratamento, existe uma diminuição cerca de 15% na SOD, 45% na CAT e de 45% na GPx. Neste mesmo trabalho, em 2 semanas de tratamento se produz um aumento das três enzimas correspondendo 20% a SOD, 37% a CAT e 45% a GPx. Este resultado nos mostra como o tratamento com MCT altera a atividade das enzimas antioxidantes em função do tempo. No nosso trabalho, encontramos nas 3 semanas uma diminuição da SOD e GPx como consequência, é provável que tenha ocorrido um aumento na concentração de peróxidos. Nesta fase, os animais com hipertrofia iniciam a sua perda quanto à proteção antioxidante.

Quanto às enzimas antioxidantes no grupo GVI, ocorreu uma diminuição da SOD total (SOD-CuZn e SOD-Mn); o GV não mostrou diferença com respeito ao grupo que somente recebeu água (GC).

Quando comparamos os grupos aos quais foi induzida hipertrofia cardíaca direita por MCT e receberam suco e vinho (GVI), ou somente suco (GSI), podemos mostrar que a administração de suco durante todo o período produz uma maior atividade da SOD total que nos leva a pensar que este grupo do suco insuficiente é um grupo com alta proteção frente ao dano oxidativo produzido por MCT.

A GPx se encontra aumentada tanto no GVI e GSI. Isto poderia dever-se a regeneração da glutathiona com a ingestão de polifenóis produzindo um aumento das defesas antioxidantes.

Os antioxidantes não enzimáticos foram avaliados em conjunto pela determinação da capacidade antioxidante total. Esta mede os antioxidantes não enzimáticos presentes no tecido. Estes se encontraram muito diminuídos com o tratamento da MCT, sendo os principais componentes a glutathione, a vitamina C, a vitamina E, os carotenóides, presentes no tecido.

Ao analisar a TRAP entre os grupos GSI e GVI nós observamos um comportamento semelhante entre ambos os grupos, podendo dizer que há um aumento nestes dois grupos em relação ao GI.

A capacidade antioxidante total do tecido cardíaco parece não se alterar com a presença de pró-oxidantes produzidos pela MCT nos grupos tratados com suco e suco mais vinho.

Um estudo de Lotito & Frei, (2003) demonstrou que a maior parte da capacidade antioxidante total plasmática em pacientes sob tratamento com maçã, um alimento também muito rico em flavonóides, era devido à frutose presente no alimento. No nosso estudo, a recuperação da TRAP nos animais onde a MCT foi administrada e que receberam suco de uva, poderia também estar relacionada à frutose. Como não trabalhamos com flavonóides isolados, vários compostos presentes nestas bebidas, podem estar contribuindo na defesa antioxidante.

Outros parâmetros analisados, foram os metabólitos do óxido nítrico (NO), os nitratos (NO_3^-) e nitritos (NO_2^-) cardíacos. Esta é uma medida indireta, porém amplamente aceita na literatura como indicativo do nível de NO produzido no tecido.

Em pacientes com insuficiência cardíaca, que são caracterizados pelo tônus vasomotor sistêmico aumentado, e concomitantemente a uma reduzida perfusão periférica, a disfunção endotelial parece estar associada à inabilidade do vaso relaxamento em resposta a estímulos fisiológicos. Um dos mecanismos envolvidos é a reduzida biodisponibilidade do NO.

Em um modelo de hipertensão pulmonar (HP) induzida pela MCT (80mg/kg peso) em ratos, Mathew e colaboradores (1997) mostraram que, após duas semanas da sua administração, os níveis plasmáticos de NO_3^- eram reduzidos em 48% quando comparados aos animais controles. Em outro estudo, Mathew e colaboradores (1995) com o mesmo modelo, após o uso da MCT, observou-se nos animais com MCT a inibição da liberação do NO derivado do endotélio nos vasos pulmonares e elevação dos níveis da endotelina-1 (ET-1), sugerindo associação com a HP.

Brunner (1999) ao usar em ratos 50mg/kg peso de MCT durante dez semanas, determinou os níveis de ET-1 e *big* ET-1 em homogeneizados dos ventrículos direitos, efluente coronariano e plasma. Nos ventrículos a *big* ET-1 e ET-1 eram inferiores nos animais tratados com MCT em relação ao grupo controle. No efluente coronariano, ambas as endotelinas eram similares ocorrendo o mesmo nos níveis plasmáticos. Os dados deste estudo supõem que a *big* ET-1 e ET-1 são possíveis mediadores da hipertensão pulmonar.

Jasmin e colaboradores (2003), usando 60 mg/kg peso de MCT, para avaliar os níveis de ET-1 no ventrículo direito e plasma, puderam constatar que, após 3 semanas da sua administração, foi encontrado, no ventrículo direito, um aumento de 198% em relação ao controle e no plasma também eram elevados em 68% comparado ao grupo controle. Demonstrou-se uma associação entre a hipertensão pulmonar e hipertrofia ventricular direita induzida por MCT com o aumento dos níveis de ET-1.

Sasaki e colaboradores (2004) em seu estudo com ratos administrando dose única por injeção de MCT (40mg /kg peso) durante 23 dias, dividiram os animais em três grupos: controle e MCT que recebiam ambos água via oral e um terceiro grupo com MCT que recebia água com L-arginina a 2,25% diariamente. Após 23 dias da intervenção, foi observado, no grupo que recebia L-arginina, um decréscimo na pressão arterial pulmonar e hipertrofia ventricular direita. Mostrou-se também uma melhora no relaxamento derivado do endotélio, sendo que a L-arginina inibiu a elevação plasmática da ET-1. Ocorreu um aumento significativo da excreção urinária de NO_3^- que é um indicador endógeno de formação de NO, enquanto enquanto que, no grupo com MCT que recebia somente água, estes efeitos não foram observados. A administração oral de L-arginina é efetiva contra o remodelamento vascular pulmonar.

Os resultados obtidos em nosso trabalho mostram que, após 3 semanas de tratamento com MCT, ocorreu uma diminuição de 52% nos nitratos no grupo insuficiente em relação ao controle. Em relação aos nitritos a redução foi de 39% no grupo insuficiente em relação ao controle. Isto coincide com os resultados encontrados por outros autores (Nakaki et al., 1990; Mathew et al., 1995). Esses resultados podem ser consequência de uma variedade de fatores como: competição pelo precursor L-arginina (através do uso de análogos), inibição da eNOS, aumento do consumo do NO, produção de prostaglandinas vasoconstritoras, falência da resposta do NO no músculo liso (Nakaki et al., 1990; Mathew et al., 1995). Não existem dados na literatura onde é avaliado o NO nas primeiras semanas de tratamento, sendo que não temos referência quanto aos níveis deste composto neste período. Uma possível explicação da redução do NO poderia ser devido a sua interação com o ânion superóxido, formando peroxinitrito, este por sua vez pode produzir danos dos lipídios e gerar maior dano oxidativo. Uma outra possível explicação está no trabalho de Nakazawa e colaboradores (1999) onde se observou que o vaso relaxamento é mediado por NO e a concentração intracelular de Ca^{2+} impedia a ativação da iNOS. Como consequência deste resultado a concentração de NO não poderia aumentar. Esta

hipótese sugere que isto nos poderia estar indicando que a ação tóxica da MCT no tecido cardíaco poderia estar envolvida em mecanismo semelhante (Figura 4.4).

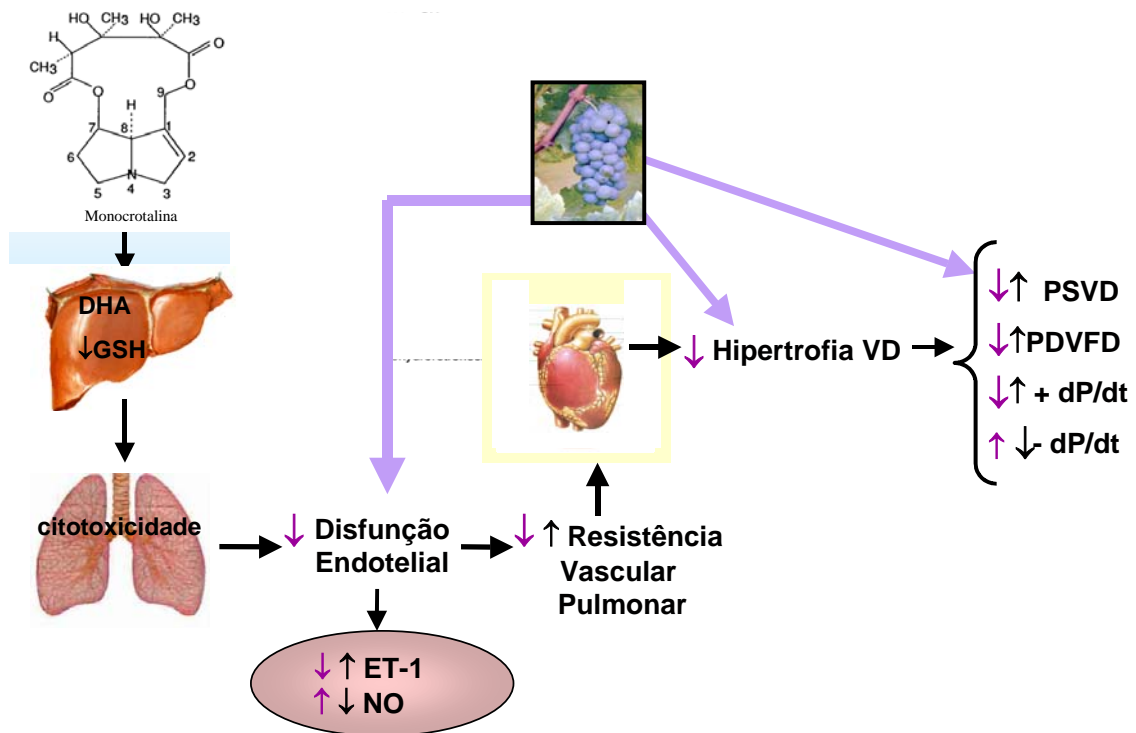


Figura 4.4 Mecanismo proposto para explicar as alterações hemodinâmicas

Os nitratos e os nitritos se encontraram diminuídos tanto no grupo suco como no grupo vinho, assim como também nos animais insuficientes. Isto poderia ser devido aos polifenóis, presentes na uva, atuariam diminuindo a concentração do ânion superóxido no tecido cardíaco, e este estaria se comportando como reativo limitante, impedindo que se produza a reação com o NO gerando peroxinitrito e por sua vez os produtos de degradação.

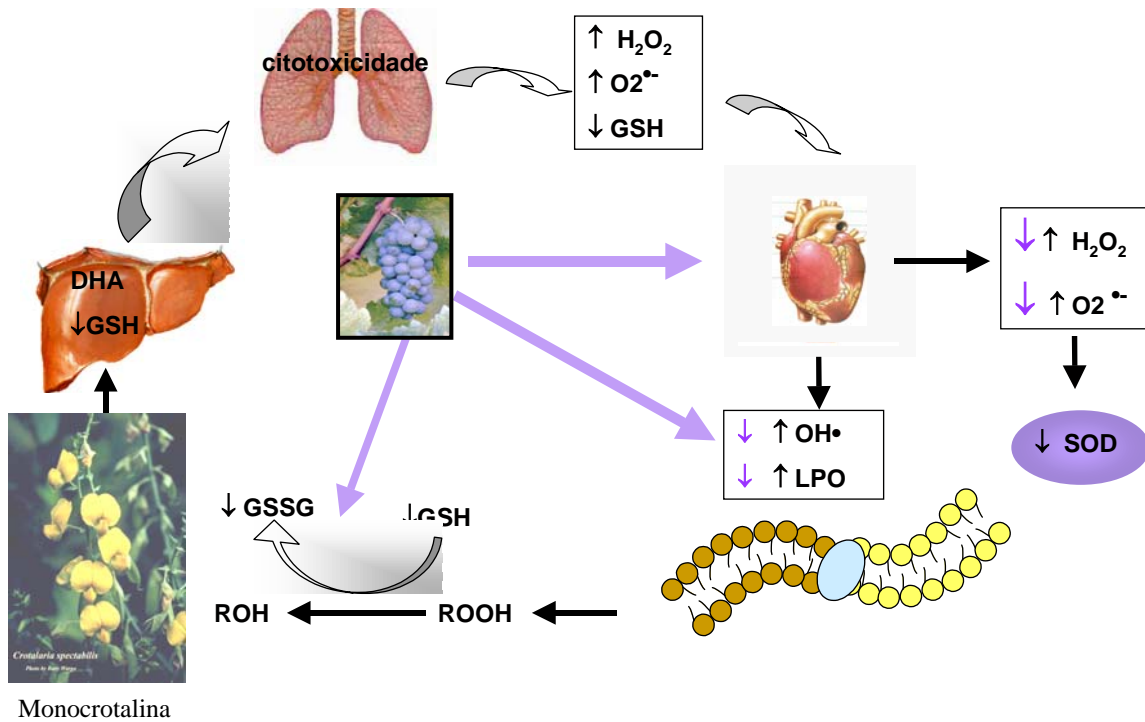


Figura 4.5 Efeito da MCT em termos de biodisponibilidade de NO, produção de EAO e sinalização intracelular para hipertrofia cardíaca e papel do suco de uva e vinho tinto

GSH = Glutaciona reduzida DHA = Dehidromonocrotalina
 GSSG = Glutaciona oxidada ROOH = Lipídio hidroperóxido

A figura 4.5 resume os principais aspectos abordados neste estudo. A MCT induziu processo hipertrófico de ventrículo direito, através das alterações promovidas em termos de remodelação de vasos pulmonares, resultando em disfunção endotelial. Este último processo caracteriza-se por uma redução na biodisponibilidade do NO, pela produção aumentada de peroxinitrito ($ONOO^-$). A MCT induz aumento na produção de EAO, levando a aumentos na lipoperoxidação e conseqüente adaptação do sistema antioxidante enzimático e não enzimático. A administração de suco de uva e vinho tinto poderia minimizar

estas ações da MCT pelo incremento nas defesas antioxidantes, atuando de maneira a inibir estas vias de sinalização intracelular, reduzindo o processo hipertrófico e redução do dano oxidativo.

5. CONCLUSÕES

A partir dos estudos *in vitro*, podemos concluir que:

- a) O vinho tinto Cabernet Franc apresenta uma capacidade antioxidante total (TRAP) cerca de 50% maior em relação ao suco de uva;
- b) A reatividade antioxidante total (TAR) do vinho mostrou uma tendência de ser superior à do suco;
- c) O vinho inibe a taxa de produção de ânion superóxido pela xantina oxidase em maior proporção do que o suco.

A análise dos resultados dos experimentos *in vivo*, nos leva a concluir que:

- a) Não houve diferença no consumo alimentar entre os grupos experimentais e as dietas com suco de uva e vinho tinto não produziram alteração nos parâmetros de crescimento dos animais nos distintos grupos;
- b) Os animais tratados com suco de uva ou suco mais vinho tornados insuficientes mostraram índices de mortalidade significativamente reduzidos;

- c) A MCT induziu congestão pulmonar, sem alterar a relação peso úmido/seco do fígado. As dietas administradas reduziram o nível de congestão pulmonar dos animais tratados com MCT;
- d) A injeção de monocrotalina (MCT) produziu hipertrofia ventricular direita, sem alterar o peso da câmara ventricular esquerda. Este efeito foi reduzido pela administração de suco e suco mais vinho;
- e) As pressões intraventriculares direitas sistólica (PSVD) e diastólica (PDFVD) foram elevadas pela administração de MCT, assim como suas derivadas temporais (+dP/dt e -dP/dt). O tratamento com suco e suco mais vinho conseguiu modular significativamente estas alterações;
- f) Nos animais onde a MCT foi administrada mostrou-se uma elevação significativa no dano aos lipídios do miocárdio, sendo que este efeito foi revertido pelo tratamento com suco e suco mais vinho;
- g) A atividade da SOD foi reduzida pelo tratamento com MCT, sendo que o tratamento com vinho não reverteu este efeito, mas o suco o fez. A atividade da CAT não foi alterada em nenhum dos grupos experimentais. A atividade da GPx foi reduzida pela MCT, sendo que tanto o vinho como somente o suco reverteram este efeito;
- h) A administração de MCT reduziu significativamente a capacidade antioxidante total (TRAP) do tecido cardíaco, sendo esta recuperada pelo tratamento com suco mais vinho e com suco;
- i) O nível de nitratos e nitritos cardíacos foi reduzido pela MCT, sendo que o tratamento com suco mais vinho restabeleceu estes níveis.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho constitui-se num estudo de prevenção primária inédito que demonstrou proteção cardiovascular com a administração *in vivo* de suco de uva preta desde o desmame dos ratos e inclusão de vinho tinto Cabernet Franc na dieta de um sub-grupo de animais onde foi induzida insuficiência cardíaca direita pela injeção do alcalóide vegetal monocrotalina. Este modelo experimental de hipertrofia de VD e, eventualmente, insuficiência cardíaca direita mimetiza a hipertensão pulmonar primária em humanos, numa síndrome conhecida como *Cor pulmonale*. Desta forma, este modelo é muito útil para se estudar o remodelamento da câmara ventricular direita. Neste modelo, o suco de uva e o suco mais vinho mostraram seus efeitos protetores tanto em termos estruturais, hemodinâmicos como de estresse oxidativo. Por se tratarem de bebidas com composição complexa não se pode atribuir os efeitos protetores a um ou outro composto. Acreditamos que os efeitos benéficos encontrados com a utilização destas bebidas possam ser resultado de um somatório de fatores. Contudo, a presença de polifenóis como os flavonóides e também da frutose do suco como sugere ricamente a literatura, possam representar uma parcela importante deste efeito protetor observado.

Na continuidade deste estudo, pretende-se explorar os mecanismos responsáveis por esta cárdio-proteção, investigando principalmente o remodelamento vascular pulmonar, através de avaliações moleculares no pulmão e vasos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIAMBELOSOM, E., Kleychov, A . L.Muller, B. Beretz, A ., Stoclet , J. C. and Andriatsitohaina, R. **Oxide Nitric production and endothelium- dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta.** *Br. J. Pharmacology.* 120: 1053-1058;1997.

BAST, A; Haene, G. R. M. ; Doelman, C.J.A . **Oxidants and antioxidants: Stale of the art** .*Am .J.Med.* 91 (Sup.3C): 3-13 1991.

BAUERMANN L. **Estudo das alterações cardiovasculares e do metabolismo de Oxigênio na anemia e na sobrecarga de ferro.** Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação- *UFRGS.* 1-140,2000.

BERNE, R. & LEVY, M. **Fisiologia.** Ed.4^a. Guanabaara Koogan. RJ. 1998.

BISBY, RH. **Interactions of vitamin E with free radicals and membranes.** *Free Radic Res Commun.*8(4-6):299-306; 1990.

BOCCO, A Culvenor, M. E; Richard H, & Berset C; **Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed Extracts.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 4,2123-2129; 1998.

BOVERIS, A. & CHANCE, B. **The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide.** *Biochem. J.* 134:707-716, 1973.

BOVERIS, A., Fraga CG, Varsavsky A and Koch O. **Increased hemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats.** *Arch. Biochem. Biophys.* 227 : 534-541,1983.

BOVERIS, A. **Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues.** *Medicina* (Buenos Aires) 58: 350-356, 1998.

BRADY PA, & TERZIC A. **Essentials of cellular heart failure.** In: Murphy JG: *Mayo clinic cardiology review.* 2nd edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; 2000.

BROIHER, KITTY. **"Red Wine's Health Benefits May Be Due in Part to 'Estrogen' in Red Wine."** *Food Processing* : 58 April; 1999.

BRUNNER, F. Cardiac Endothelin and big endothelin in right-heart hypertrophy due to monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rat. ***Cardiovascular Research* ,44 : 197-206, april; 1999.**

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. **Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.** *Physiol. Rev.* 59(3):527-625, 1979.

KHAPER, N. Farahmand F.; Belló-Klein, A. **Oxidative Stress in congestive heart failure.** *current Cardiology Reports*, 2:206-211,2000.

COMINI L, Angoletti G, Panzali A, Mantero G, Pasini E, Gaia G, Albertini A, Ferrari R. **Activation of atrial natriuretic peptide synthesis during congestive heart failure in rats treated with monocrotaline.** *Am. J. Physiol.* 268: H391-H398;1995.

COSTA, A Farmacognosia. *Fundação Calouste Gulbenkian*. 4^o edição. Lisboa; 1994

DAY AP, Kemp HJ, Bolton C. Hartog M, Stansbie D. Effect of concentrated red grape juice consumption on serum antioxidant capacity and low-density lipoprotein oxidation. *Ann Nutr Metab*;41(6):353-7; 1997.

DEL MAESTRO, R. An approach to free radicals in Medicine and Biology. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 492: 153-167; 1980.

DELL'AGLI, M. BUSCIALÁ, A., AND BOSISIO, E.; Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovascular Research*, Vol. 63, 4, 593-602, 2004.

DEMROW, H.S. Slane, P.R. Fotls, J.D. Coronary Artery Disease/Platelets: Administration of Wine and Grape Juice Inhibits *in Vivo* Platelet Activity and Thrombosis in Stenosed Canine Coronary Arteries. *Circulation*. 91: 1182-1188; 1995.

DICARLO V.S., Chen, S. J., Meng, Q.C. ET_A - Receptor Antagonist Prevents and reverses chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in rat. *Am. J. Physiol.* 269,L697; 1995.

DUBEY, R. K.; JACKSON, E. K. & LÜSCHER, T. F. Nitric oxide inhibits angiotensin II -induced migration of rat aortic smooth muscle cell: role of cyclic-nucleotides and angiotensin 1 receptors. *J. Clin. Invest.* 96: 141-149, 1995.

DURAK I, Avcı A, Kacmaz M, Büyükkocak S, Cimen MY, Elgun S, Öztürk HS. Comparison of antioxidant Potentials of red wine, white wine, grape juice and alcohol. *Curr Med Res Opin* 15(4):316-20,1999.

ECARNOT- LAUBRIET, A, Rochette L, Vergely C, Sicard P, Teyssier JR. The activation pattern of the antioxidant enzymes in the right ventricle of rat in response to pressure overload is of heart failure type. *Heart Dis*; 5(5):308-12. 2003.

ESTRUCH, R MD. Wine and Cardiovascular disease. *Food Research Internacional*. 33:219-226; 2000.

FARAHMAND F, Hill MF. Singal PK, Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor Pulmonale. *Mol Cell Biochem*.260(1-2)21-9. 2004.

FENTON, H. J. H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc.* 65: 899-910, 1894.

FITZPATRICK, D.F, Hirschfield, S.L. Coffey, R.G. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products, *Am. J. Physiol.* 265 H774-H778; 1993.

FLOHÉ, L.; Gunzler, W. A. Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105:14–121; 1984.

FRANKEL, E. N., Kanner. J.B. German, E Parks, J. E. Kinsella. Principle phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density Lipoprotein. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 890-894;1995.

GIORDANO, F.J; Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure

The Journal of Clinical Investigation. Vol:115; 3; 2005.

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

GONZALEZ FLECHA, B.; LLesuy, S.; Boveris, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart and muscle. *Free Rad. Biol. Med.* **10:41–47; 1991.**

GORINSTEN, S, Zachwieja Z, Katrich E, Pawelzik E, Haruenkit R, Trakhtenberg S, Martin-Belloso O. Comparison of the contents of the main antioxidant compounds and the antioxidant activity of white grapefruit and his new hybrid. *Lebensm-Wiss.u. Technol.* **37, 337-343; 2004.**

GRANGER, D.L.; Anstey, N.M. Miller, W.C; Weinberg, J.B. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods in Enzimology.* **301: 58-61; 1999.**

GRONBAEK M, Becker U, Jahansen A, Gottschau P, Schnohr H.O, Hein G, Jensen T.I, **Type alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease, and cancer**, *Ann. Int. Med.* **133: 411-419; 2000.**

GSCHWEND. S, Buikema. H, Henning.r, Wiek. H, Gilst. V. Endothelial dyssfunction and infarct-size relate to impaired EDHF response in rat experimental chronic heart failure. *The European Journal of Heart Failure.***5 147-154; 2003.**

GUARNIERI, C. and Muscari C; Beneficial effects of trimetazidine on mitochondrial function and superoxide production in the cardiac Muscle of monocrotaline-treated rats. *Biochem Pharmacol.* **15;37(24):4685-8;1988.**

GUIMARÃES, J. L. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o diagnóstico e tratamento da insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol*, **72 (suplemento 1): 4-30; 1999.**

HABER , F. , Weiss, J .The Catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *proc. R. Soc. London*, **A147: 332-351, 1934.**

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBI, W.B. Glutathione S-Transferases. *The Journal of Biological Chemistry*. 249, 22:7130-7139, 1974.

HALDEMAN, GA. & Croft, J.B. **Hospitalization of patients with heart failure: National Hospital Discharge Survey, 1985 to 1995.** *Am Heart J*, 137:352-60; 1999.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.C. **Free radicals in biology and medicine.** 2nd Edition. *New Kork : Oxford university Press*, 1989.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.C. **Free radicals in biology and medicine.** 3th Edition. *Clarendon Press. Oxford*, 1999.

HEATHER S. Demrow, BS; Peter R. Slane, BS; John D. Folts, PhD. **Administration of Wine and Grape Juice Inhibits In Vivo Platelet Activity and Thrombosis in Stenosed Canine Coronary Arteries.** *Circulation*,. *American Heart Association*, 91:1182-1188 1995.

HERVÉ, P. Lebec. D, Brenot, F. Pulmonary vascular disorder in portal hypertension. *Eur Respir J*, 11:1153-66;1998.

HILL MF. & Singal PK.. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. **148(1):291-300.1996.**

HO KKL, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D. **The epidemiology of heart failure: The Framingham Study.** *J Am Coll Cardiol*. 22:6A-13A; 1993.

HUNT, S. A. **ACC/AHA Guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult.** *Circulation*, 1-52; 2001.

JAYAPRAKASHA. G.K, Singh. R.P, Sakariah. K.K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidacion models *in vitro*. ***Food Chemistry* 73,285- 290; 2001.**

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

JESSUP, M. and Brozena, S. Heart Failure. *N Engl J Med*, 348: 2007-18; 2003.

JONG, Erna Vogt; **Influência de dietas normo e hiperlipídicas sobre o perfil nutricional, parâmetros bioquímicos séricos e estruturais do fígado de ratos Wistar –Tese Doutorado.** Orientador - Débora de Queiroz Tavares -Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, SP, 140p, 1998.

KAISER, S, Di Mascio P, Murphy ME, and Sies H. **Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols.** *Arch Biochem Biophys.* 15;277(1):101-8; 1990.

KAY JM, Keane PM, Suyama KL, Gauthier D. **Angiotensin converting enzyme activity and evolution of pulmonary vascular disease in rats with monocrotaline pulmonary hypertension.** *Thorax* 37: 198-204; 1982.

KEITH, M., Geranmayegan A, Sole MJ. FACC A, Kurian R, Robinson A, Omran AS, and Khursheed N. Jeejeebho. **Increased Oxidative Stress in Patients With Congestive Heart Failure.** *J Am of Cardiology*, 31:6:1352-1356;1998.

KEEVIL JG, Osman HE, Reed JD, Folts JD. **Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation.** *J Nutr*, 130(1):53-6; 2000.

KRINSKY, N.I **Antioxidant functions of carotenoids.***Free Rad.Biol Med.* 7: 617-635,1989.

KUCHEL O, Cantin M, Boo N, Debinski W, Jasmin G, Genest J. **Catecholamine dopamine hydroxylase and atrial natriuretic factor content in separate heart chambers of cardiomyopathic hamster.** *Life Sci* 41:2333-2338; 1987.

LANDMESSER, MD; Stephan Spiekermann, MD; Sergey Dikalov, PhD; Helma Tatge, BS; Ragna Wilke, BS; Christoph Kohler, MD; David G. Harrison, MD; Burkhard Hornig, MD; Helmut Drexler, MD. **Vascular Oxide Stress and Endothelial Dysfunction in Patients With Chronic Heart Failure Role of Xanthine Oxidase and Extracellular Superoxide Dismutase.** *Circulation.* 106:3073-3078;2002.

LEE YS, Byun J, Kim JA, Lee JS, Kim KL, Suh YL, Kim JM, Jang HS, Lee JY, Shin IS, Suh W, Jeon ES, Kim DK. **Monocrotaline-induced pulmonary hypertension correlates with upregulation of connective tissue growth factor expression in the lung.** *Exp Mol Med.* 28;37(1):27-35;2005.

LLESUY, S. F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOVERIS, A.; MILEI, S. **Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadrimicin in mice.** *Tumor,* 71:241–249, 1985.

LLESUY, S. F; & Repetto, G.G, Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Brazilian J. of Med. And Biol. Research.* 35: 523-534, 2002.

LISSI, E.; Pascual, C.; Del Castillo, M.D. Luminol luminescence induced by 2,2'-azobis (2-amidino-propane) thermolysis. *Free Rad. Res. Comms.* 17:299-311; 1992.

LOTITO S.B. and FREI B. **The increase in human plasma antioxidant capacity after apple consumption is due to the metabolic effect of fructose on urate,**

not apple-derived antioxidant flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*, 37:2, 251-258, 2004.

LOWRY, O. H.; Rosebrough, A. L.; Farr, A. L.; Randall, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–275, 1951.

LUGASI, A. & Hovari J. Antioxidant properties of commercial alcoholic and nonalcoholic beverages. *Nahrung.* 47(2):79-86, 2003.

LUZ, P.L., Serano JCV., Chacra A., Monteiro HP., Yoshida VM., Furtado M., Ferreira S, Gutierrez S, and Pileggi, F. **The effect of red wine on experimental atherosclerosis: lipid-independent protection,** *Exp. Mol. Pathol.* 65- 150-159; 1999.

LUZ P.L and Coimbra S.R. **Wine, alcohol and atherosclerosis: clinical evidences and mechanisms.** *Braz J Med Biol Res*, 37(9) 1275-1295 (Review), 2004.

MACHLIN, LJ. & Bendich A Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal* 1: 441-445, 1987.

MARTÍNEZ, M **Metodos de Análisis de Drogas y Estratos.** Editorial Félix Varela. Ciudad de Habana. 1996.

MARTÍNEZ, M. **Farmacognosia y Productos Naturales.** Editorial Félix Varela. Havana; 2001.

MARKLUND,S. Handbook of methods for Oxiyen. Research .**Boca Raton.** CRC Press. 243-247; 1985.

MATHEW R, Zeballos G. A. Tun. H. Gewitz M. H. **Role of nitric oxide and endothelin-1 in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats.** *Cardiovascular Research* 30, 739-746; 1995.

MATHEW R, Zeballos G. A, Gloster. T. Sundararajan. C, Gewitz M. H. **Role of inhibition of nitric oxide production in monocrotaline-induced pulmonary hypertension.** *Appl. Physiol.* 82(5): 1493-1498; 1997.

MATHEW R, Yuan N, Rosenfeld L, Gewitz MH, Kumar A. **Effects of monocrotaline on endothelial nitric oxide synthase expression and sulfhydryl levels in rat lungs.** *Heart Dis*;4(3):152-8. 2002.

McALISTER FA, & Teo KK. **The management of congestive heart failure.** *Postgrad Med J.*; 73: 194-200, 1997.

MEDEIROS R. M.T, Górnaiak S.L., and Guerra J.L. **Fetotoxicity and reproductive effects of monocrotaline in pregnant rats.** *J. of Ethnopharmacology* , Feb. 69(2): 181-188, 2000.

MEERSON FZ, Kagan VE, Koslov YP, Belkina LM, & Arkipenko YV. The role of lipid peroxidations in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. *Basic Res. Cardiol.* 77: 465-485, 1982.

MERKEN. H. M. Beecher.G.R. **Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones.** *J. Chromatogr. A* 897, 177; 2000.

MEYRICK, B, Gamble W, and Reid L. **Development of *Crotalaria* pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study.** *Am J Physiology.* 239; H692-H702, 1980.

MICHEL, T. & FERON O, **Perspective Series: Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthases: Which, Where, How, and Why?**. *America Society for Clinical Investigation, Inc.* 100(9): 2146-2152; 1997.

MILLS, G.C. Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxide in animal tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 86:1-5, 1960.

MIYAUCHI T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, Yano M, Yamaguchi I, Sugishita Y, Goto K. **Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardipulmonary alteration in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertensin.** *Circ Res*; 73: 887-97; 1993.

MONCADA, S. **Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology.** *Pharmacol. Review*, 43:109-142, 1991.

NAKAKI T. Nakauoma M. Kato R. **Inhibition by nitric oxide and nitric oxide producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells.** *Eur J Pharmacol*, 189:947-353; 1990.

NAKAZAWA, H. M Hori., Ozaki H & H. Karaki. **Mechanisms underlying the impairment of endothelium-dependent relaxation in the pulmonary artery of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats.** *British Journal of Pharmacology* 128: 1098-1104;1999.

NDIAYE. M, Chataigneau. T, Andriantsitohaina. R, Stoclet. J-C and Schini-Kerth. V.B; **Red Wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism.** *Biochemical and Biophysical Communications*,310, 371-377;2003.

NEGRÃO, C. E. and Barreto, A.C. Efeito do Treinamento físico na insuficiência cardíaca: implicações autonômicas, hemodinâmicas e metabólicas. *Ver. Soc Cardiol Estado de São Paulo*, 8: 1-12 ; 1998.

NGUYEN, Q.T., cernacek, P., Calderone, A. **Endothelin-A receptor blockade causes adverse left ventricular remodeling but improves pulmonary artery pressure after infarction in the rat.** *Circulation* 98, 2323-2330; 1998

NOROOZI. M, Angerson, W.J, Lean. M.E.J. **Effects of flavonoids and Vitamin C on oxidative damage to human lymphocytes.** *Am. J. Clin Nutr*, 67 : 1210-8; 1998.

PATAKI,T; Bak, I; Kovacs, P; Bagchi, D; Das, D. and Tosaki, A; **Grape seed proanthocyanidins improved cardiac recovery during reperfusion after ischemia in isolated rat hearts.** *Am J Clin Nutr.* 75: 894-899. 2002.

PENNY M, Etherton K, Hecker D.K, Bonanome A, Voval S. Binkoski A E, Hilpert K. F, Griel A E, Etherton T.D, **Bioactive Coumpounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer.** *Am J Med.* 113 (9B). 71S-88S. 2002.

PETERSON, J. & DWYER, J. **Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity.** *Nutr Res.* 18:1995-2018. 1998.

PICHARDO, J. Palace V; Farahmand,F. and Singal,P.K; **Myocardial Oxidative Stress Changes During Compensated Right Heart Failure in Rats.** *Mol Cel Biochem*; 196:51-57, 1999.

PRIÉ, S LEUNG, T. K., Cernacek, P., ryan, J. w. and Dupuis, J. O. **Rrally active ET_A Receptor antagonist LU 135252 prevents the development of pulmonary hypertension and endothelial metabolic dysfunction in monocrotaline-treated rats.** *J. Pharm. Exp. Ther.* 282, 1312-1318; 1997.

RENAUD S, Gueguen R. **The French pardox and wine drinking.** *Novartis Found Symp.* 216: 208-217. 1998.

RICHTER, C. & FREI, B. **Ca²⁺ release from mitochondrial induced by prooxidants.** *Free Rad. Biol. Med.* 4: 365-375, 1988.

RICE-EVANS C.A, Miller N. J & Paganda G. **Antioxidant properties of phenolic compounds.** *Reviews.* 2(4), 1997.

ROBACK J, Grygkewski RJ. **Flavonoids are scavengers of superoxide anions.** *Biochem Pharmacol* 37:837-41. 1988.

RODEHEFFER R.J. Lerman. Increased plasma concentrations of endothelin in congestive heart failure in humans. *Mayo Clin Proc*, **67:719-724; 1992.**

RUNO, J.R., Loyd,J.E. Primary pulmonary hypertension. *Lancet.* 361: 1533-44; 2003.

SCHLANT R.C. Sonnenblick E.H. Katz A. M. **Normal physiology of the cardiovascular system.** In: Alexander R.W, Schlant RC, Fuster V (editors): *Hurst's the heart, arteries and veins*, 9th edition, *McGraw-Hill, New York*, 1998.

SAKAI,S. MIYAUCHI T. SAKURAI, T. KASUYA Y. IHARA M YAMAGUCHI I. GOTO K. SUGISHITA Y. ENDOGENOUS.Endogenous endothelin-1 production participates in maintenance of cardiac function in rats with congestive heart failure. *Circulation* **93, 1214-1222;1996.**

SASAKI, S. Asano M. Ukar T. Nomura N. Maruyama K. Manabe T. Mishima A; Nitric Oxide formation and plasma L-arginine levels in pulmonary hypertensive rats *Respiratory Medicine* **98, 205-212; 2004.**

SHI J, Yu J, Pohorly JE, and Kakuda Y. **Polyphenolics in grape seeds- Biochemistry and Functionality,** *J Med. Food.* 6 (4), 291-299, 2003.

SIES H. & Murphy, M.E. **Role of Tocopherols in the protection of Biological. Against Oxidative Damage.** *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 8: 211-224, 1991.

SIES, H. **Antioxidants in Diseases : Mechanisms and Therapy.** Advances in Pharmacology vol. 38. *California: Academic Press.*1997.

SINGAL P. K, Khaper, N. Belló-Klein, A. Bhayana, M. **Oxidative stress status in the transition of hypertrophy to heart failure.** *Heart Failure Reviews*,4:18,1999.

SMITH LW, & CULVENOR CCJ. Plant sources of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids. *J. Nat. Prod.* 44(2), 129-152; 1981.

SOTO-BLANCO, B. Medeiros R.T.M, Guerra J.L. Górniak S.L. **Lack of protective action of cysteine against the fetotoxic effect of monocrotaline.** *Food and Chemical Toxicology* 39: 635-639; 2001.

SOUTHORN, P. & POWIS, G. Free Radicals in Medicine. **I. Chemical Nature and Biologic Reaction.** *Clin. Proc*, (63):381–389, 1988.

SPENCER, H. Schroeter, A . J. Grossthwaithe, G. Kuhnle, R.J. Williams, C. Rice-Evans, **Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts,** *Free Radic Biol Med* 31: 1139-1146, 2001

STEIN JH, Keevil JG, Wiebe DA, Aeschlimann S, Folts JD. **Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease.** *Circulation*;100(10):1050 – 5, 1999.

STEVEN Y.B, Kinser S, Hill D.A , Barton C.C, Hotchkiss J.A, Harkema J.R, Ganey P.E, and Roth R.A. Synergistic Hepatotoxicity from Coexposure to

Bacterial Endotoxin and the Pyrrolizidine Alkaloids Monocrotaline. ***Toxicol. Appl. Pharmacol.* 166, 173-185. 2000.**

ST LEGER AS, Cochrane AL, Moore F. **Ischaemic heart-disease and wine.** *Lancet.* Jun 16;1(8129):1294. 1979.

TAYLOR, D. W, Wilson D.W, Lamé M.W, Dunston S. D, Jones A .D, and Segall H. J. Comparative Cytotoxicity of Monocrotaline and its Metabolites in Cultured Pulmonary Artery Endothelial Cells. ***Toxicology and Applied Pharmacology* 143,196-204.1997.**

THOMAS, H. C. M.W. Léme S.K. dunston, H.J. segall, and D.W. Wilson Monocrotaline Pyrrole Induces Apoptosis in Pulmonary Artery Endothelial Cell. ***Toxicology and Applied Pharmacology* 151, 236-244; 1998.**

TODOROVICH-Hunter L, Dodo H, Ye C, Mc Cready L, Keeley FW, Rabinovich M. **Increased pulmonary artery elastolytic activity in adult rats with monocrotaline-induced progressive hypertensive pulmonary vascular disease compared with infant rats with nonprogressive disease.** *Am. Rev. Respir. Dis.* 146: 213-223, 1992.

TOMBE, PIETER P. de. **Altered contractile function in heart failure.** *Cardiovascular Research* 37, 367-380; 1998.

TYLER, VARRO E. "Grape Expectations." ***Prevention: 80-84., 1997.***

YEN, G.C., & Hsieh, C.L. **Antioxidant activity of extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various peroxidation models in vitro.** *J of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 3952-3957; 1998.

YU, P.B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*. **74(1):139–162, 1994.**

VEYSSIER-BELOT C. & Cacoub P. Role of endothelial and smooth muscle in the physiopathology and treatment management of pulmonary hypertension, *Cardiovascular Research*. **44, 274-282;1999.**

VISIOLI, F. Borsani L, Galli C. **Diet and prevention of coronary Heart Disease: the potential Role of Phytochemicals.** *Cardiovascular Reserarch*, 47:419-425;2000.

WALLERATH, T. & Poleo D, Red Wine increase the expresson of human endotelial nitric oxide Syntase. *J. of American College of Cardiology*; **41(3);471-478, 2003.**

WALSH RA, & Dorn GW. Growth and hypertrophy of the heart and blood vessels. In: Alexander RW, Schlant RC, Fuster V(editors): *Hurst's The Heart, Arteries and Veins*, 9th edition, McGraw-Hill, New York; 1998.

WANG, Shu-Ping, Huang K.J. **Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis.** *J. of Chromatography A*, 1032, 273-279; 2004.

WANG, Yu-Ping, Yan J, Fu PP, Chou MW. Human liver microsomal reduction of pyrrolizidine alkaloid N-oxides to form the corresponding carcinogenic parent alkaloid. *Toxicology Letters*, **155; 411-420, 2005.**

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. *Meth. Enzymology*. **77: 325-333. 1981.**

WILSON DW, Segall HJ, Pan LC, Dunston SK. **Progressive inflammatory and strutural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats.** *Microvasc. Res.* **38: 57, 1999.**

ZHANG J. Zhang J. Zhao Y, Sie H. **Effects of beta-carotene and vitamin C on the expression of c-myc in human leukemic cell.** *Wei Sheng Yan Jiu*; 30(3): 160-2. 2001.