

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

Guilherme de Oliveira Branco

**A AÇÃO VASODILATADORA DO EXTRATO DE COGUMELO *PLEUROTUS*
ALBIDUS EM ARTÉRIAS PULMONARES DE RATOS WISTAR É ATENUADA NA
HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA**

Porto Alegre

2023

Guilherme de Oliveira Branco

**A AÇÃO VASODILATADORA DO EXTRATO DE COGUMELO *PLEUROTUS*
ALBIDUS EM ARTÉRIAS PULMONARES DE RATOS WISTAR É ATENUADA NA
HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Fisiologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Paulo Cavalheiro Schenkel
Coorientador(a), Prof. Dra. Adriane Belló Klein

Porto Alegre

2023

Guilherme de Oliveira Branco

A AÇÃO VASODILATADORA DO EXTRATO DE COGUMELO *PLEUROTUS ALBIDUS* EM ARTÉRIAS PULMONARES DE RATOS WISTAR É ATENUADA NA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA COM MONOCROTALINA

Dissertação de mestrado apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção de título de mestre em: Fisiologia

Aprovado em: 31 de outubro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Cristina Campos Carraro
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Jucimara Baldissarelli
Universidade Federal de Pelotas

Dra. Daniela Volcan Almeida
Universidade Federal de Pelotas



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CARTA DE APROVAÇÃO/ADENDO

Número: 40049

Título: INFLUENCIA DO EXTRATO DE PLEUROTUS ALBIDUS NA REATIVIDADE DE GRANDES ARTERIAS NUM MODELO DE HIPERTENSAO PULMONAR INDUZIDO POR MONOCROTALINA EM RATOS

Pesquisador Responsável: ADRIANE BELLO KLEIN

A Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o Adendo ao Projeto INFLUENCIA DO EXTRATO DE PLEUROTUS ALBIDUS NA REATIVIDADE DE GRANDES ARTERIAS NUM MODELO DE HIPERTENSAO PULMONAR INDUZIDO POR MONOCROTALINA EM RATOS em reunião realizada em reunião no dia 23/08/2021, no ambiente virtual Mconf - UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 64 ratos Wistar machos, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL-UFRGS) de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa. **Este documento revoga a Carta de Aprovação emitida anteriormente.**

Porto Alegre, 03 de setembro de 2021.

Alexandre Tavares Duarte de Oliveira

Coordenador da CEUA/UFRGS

RESUMO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença caracterizada pelo remodelamento obstrutivo do parênquima pulmonar que resulta no aumento da pós-carga imposta ao ventrículo direito. Já é bem conhecida a relação do desequilíbrio redox com a HAP e, dessa forma, terapias antioxidantes têm sido propostas. O extrato do cogumelo *Pleurotus albidus* (*P. albidus*) pode ser um adjuvante no tratamento da HAP por sua conhecida ação antioxidante. O principal objetivo do presente trabalho foi analisar o potencial vasodilatador do extrato de *Pleurotus albidus* em artérias pulmonares de ratos com HAP induzida por monocrotalina e analisar a influência do estresse oxidativo no tecido pulmonar. Os experimentos foram todos realizados somente após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (n.º. 40049). Para isso, ratos Wistar com aproximadamente 45 dias de vida e pesando \pm 200 gramas foram randomicamente divididos em dois grupos: Controle (CTRL; n=13) e monocrotalina (MCT; n= 12). A indução da HAP foi realizada por dose única de monocrotalina (60 mg/kg – i.p.) e os animais tiveram o peso corporal mensurado no início aos 7 e aos 21 dias. Passados 21 dias, os ratos foram anestesiados e submetidos à eutanásia por decapitação para coleta da artéria pulmonar e dos pulmões. As artérias foram cuidadosamente limpas e fixadas em ganchos de aço inoxidável para mensuração da tensão isométrica frente a diferentes desafios no aparato de reatividade vascular. No primeiro experimento, após teste de viabilidade vascular e estabilização dos vasos, foi adicionada fenilefrina (1 μ M) para induzir pré-contracção, seguida de uma curva com doses crescentes de extrato de *P. albidus* (0,0047, 0,00947, 0,0188, 0,0376, 0,075, 0,15, 0,3, 0,6 mg/mL) com objetivo de avaliar seu potencial vasodilatador. Num segundo momento, os vasos foram incubados previamente com Nw-nitro-arginina-metil-ester (L-NAME, 100 μ M) e submetidos a protocolo descrito para o primeiro experimento. Amostras de pulmão foram coletadas para análises de parâmetros de estresse oxidativo. Para isso, os pulmões foram incubados com extrato de *P. albidus* por 30 minutos e, posteriormente, expostos a um modelo gerador de radicais livres por mais 30 minutos. Ao término desse período, foram quantificados os níveis de espécies reativas de oxigênio, a lipoperoxidação e as sulfidrilas. Para análise dos resultados da reatividade vascular, foi utilizada ANOVA de 2 vias para medidas repetidas. As áreas sob a curva e os parâmetros bioquímicos foram comparados utilizando teste t de Student. Como resultados, observamos que o grupo MCT apresentou menor ganho de peso quando comparado ao CTRL $P < 0,05$. No grupo CTRL, o extrato de *P. albidus* promoveu um relaxamento progressivo da artéria pulmonar, enquanto, no grupo MCT, não verificamos acréscimos no relaxamento em concentrações acima de 0,0188 mg/mL. Ainda, o relaxamento foi significativamente menor no grupo MCT em relação ao CTRL, nas doses maiores que 0,075 mg/mL do extrato. A inibição das NOS reduziu significativamente a resposta vasodilatadora do *P. albidus* apenas no grupo CTRL, tornando essa semelhante ao grupo MCT. A lipoperoxidação foi significativamente maior em homogeneizados de pulmão dos animais do grupo MCT; já as espécies reativas de oxigênio (ROS) e sulfidrilas não diferiram entre os grupos e o extrato do cogumelo não alterou de forma significativa as variáveis bioquímicas. Em conclusão, o extrato de *P. albidus* apresenta potencial vasodilatador em artérias pulmonares de ratos Wistar, sendo essa resposta prejudicada após administração de monocrotalina, em parte, por atenuar a participação do NO para regular o tônus da artéria pulmonar.

Palavras-chave: antioxidante, estresse oxidativo, LNAME, óxido nítrico sintase, pulmão, reatividade vascular.

ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a disease characterized by obstructive remodeling of the lung parenchyma that results in increased afterload imposed on the right ventricle. The relationship between redox imbalance and PAH is well known and antioxidant therapies have been proposed. In this context, *Pleurotus albidus* (*P. albidus*) mushroom extract may be an adjuvant in the treatment of PAH due to its known antioxidant action. Accordingly, the main objective of the present study was to analyze the vasodilator potential of *Pleurotus albidus* extract in pulmonary arteries of rats with monocrotaline-induced PAH and to analyze the influence of oxidative stress on lung tissue. All experiments were performed only after approval by the animal research ethics committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (n°. 40049). For this purpose, Wistar rats aged approximately 45 days and weighing \pm 200 grams were randomly divided into two groups: Control (CTRL; n=13) and monocrotaline (MCT; n= 12). PAH induction was performed by a single dose of monocrotaline (60 mg/kg - i.p.) and the animals had their body weight measured at the beginning, at 7 and at 21 days. After 21 days, the rats were anesthetized, then euthanized by decapitation to collect the pulmonary artery and lungs. The arteries were carefully cleaned and secured on stainless steel hooks for measurement of isometric tension against different challenges in the vascular reactivity apparatus. In the first experiment, after testing vascular viability and vessel stabilization, phenylephrine (1 μ M) was added to induce pre-contraction, followed by a curve with increasing doses of *P. albidus* extract (0.0047, 0.00947, 0.0188, 0.0376, 0.075, 0.15, 0.3, 0.6 mg/mL) in order to evaluate its vasodilator potential. In a second step, vessels were previously incubated with Nw-nitro-arginine-methyl-ester (L-NAME, 100 μ M), and subjected to the protocol described for the first experiment. A lung sample was collected for analysis of oxidative stress parameters. For this, lungs were exposed to *P. albidus* extract for 30 min and subsequently exposed to a free radical generating model for another 30 min. At the end of this period, the levels of reactive oxygen species, lipoperoxidation and sulfhydryl were quantified. For analysis of vascular reactivity, results were analyzed using 2-way repeated measures ANOVA. Areas under the curve and biochemical parameters were compared using Student's t-test. We observed that the MCT group showed lower weight gain when compared to CTRL $P < 0.05$. While in the CTRL group the *P. albidus* extract promoted progressive relaxation, in the MCT group we did not find increases in relaxation at concentrations above 0.0188 mg/mL. Also, relaxation was significantly lower in the MCT group compared to the CTRL group at doses higher than 0.075 mg/mL. NOS inhibition significantly reduced the vasodilator response of *P. albidus* only in the CTRL group, making it similar to that of the MCT group. Lipid lipoperoxidation was significantly higher in the MCT group, while reactive oxygen species (ROS) and sulfhydryl did not differ between groups, and the mushroom extract did not significantly alter biochemical variables. In conclusion, *P. albidus* extract shows vasodilator potential in pulmonary arteries of Wistar rats, this response being impaired after monocrotaline administration, in part because it attenuates the participation of NO in regulating pulmonary artery tone.

Keywords: antioxidant, oxidative stress, LNAME, nitric oxide synthase, lung, vascular reactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planta *Crotalaria spectabilis*, as espécies que mais produzem MCT

Figura 2. Cogumelo *Pleurotus albidus*.

Figura 3. Anel de artéria pulmonar no sistema de banho de órgãos isolado

Figura 4. Registro representativo do protocolo padrão para testagem da viabilidade dos vasos a da resposta ao extrato de *Pleurotus albidus*.

Figura 5. Registro representativo da resposta vasodilatadora induzida pelo extrato de *Pleurotus albidus* em anéis de artérias pulmonares pré-incubadas com L-NAME

Figura 6. Curva de relaxamento induzido pelo extrato de *Pleurotus albidus* em anéis de artéria pulmonar previamente incubados com L-NAME ou não e contraídos com fenilefrina (1 μ M). * menor relaxamento do grupo MCT e CTRL-LNAME em relação ao grupo CTRL na respectiva dose experimental.

Figura 7. Área sob a curva de relaxamento de anéis de artérias pulmonares expostos a diferentes concentrações de extrato de *P.albidus*

Figura 8. Lipoperoxidação pelo método de TBARS em homogeneizado de tecido pulmonar de ratos CTRL e MCT incubadas com extrato de *Pleurotus albidus* (0,3 ml/mg) ou água destilada e expostos ao sistema gerador de radicais livres

Figura 9. Níveis de espécies reativas de oxigênio totais em homogeneizado de tecido pulmonar de ratos CTRL e MCT incubados com extrato de *Pleurotus albidus* (0,3 ml/mg) ou água destilada e expostos ao sistema gerador de radicais livres

Figura 10. Níveis de sulfidrilas em homogeneizado de tecido pulmonar de ratos CTRL e MCT incubados com extrato de *Pleurotus albidus* (0,3 ml/mg) ou água destilada e expostos ao sistema gerador de radicais livres

LISTA DE ABREVIATURAS

MCT - Monocrotalina

HP - Hipertensão pulmonar

mPAP - Pressão média da artéria pulmonar

HAP - Hipertensão arterial pulmonar

VD - Ventrículo direito

ROS - Espécies reativas de oxigênio

ATP - Adenosina trifosfato

NO - Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintase

NADPH - Fosfato de dinucleotídeo nicotinamida adenina

BH4 - Tetrahydrobiopterina

P.albidus - *Pleurotus albidus*

Phe - Fenilefrina

CTRL - Controle

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

Ach - Acetilcolina

L-NAME – nitro-L-arginina metil éster

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

DCF - Diclorofluoresceína

TNB - 2-nitro-5-tiobenzoato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	HIPERTENSÃO PULMONAR.....	1
1.2	HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR.....	3
1.3	FISIOPATOLOGIA DA HAP.....	3
1.4	ESTRESSE OXIDATIVO.....	5
1.5	OXIDO NÍTRICO.....	5
1.6	MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDO POR MONOCROTALINA.....	7
1.7	TRATAMENTOS.....	8
1.9	TERAPIAS ALTERNATIVAS.....	9
1.10	<i>PLEUROTUS ALBIDUS</i>	10
2	OBJETIVOS	11
2.1	OBJETIVO GERAL.....	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3	MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1	OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>PLEUROTUS ALBIDUS</i>	12
3.2	BIOÉTICA COM OS ANIMAIS.....	13
3.3	ANIMAIS.....	13
3.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	14
3.5	INDUÇÃO DE HAP ATRAVÉS DA ADMINISTRAÇÃO DE MONOCROTALINA.....	14
3.6	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	14
3.7	REATIVIDADE VASCULAR.....	15
3.8	PREPARO DO PULMÃO PARA ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	17
3.9	ESPÉCIES REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).....	18
3.10	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO TOTAIS.....	18
3.11	SULFIDRILAS.....	18
3.12	DESCARTE DE RESÍDUOS.....	19
3.13	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	19
4	RESULTADOS	20
4.1	PESO CORPORAL.....	20

4.2	REATIVIDADE VASCULAR.....	20
4.2.1	Avaliação da resposta contrátil induzida por KCL e fenilefrina	20
4.3	RELAXAMENTO COM <i>P. ALBIDUS</i>	21
4.4	INFLUÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NO RELAXAMENTO INDUZIDO PELO <i>P. ALBIDUS</i>	22
4.5	ESTRESSE OXIDATIVO EM HOMOGENEIZADO DE PULMÃO	23
5	DISCUSSÃO.....	26
6	CONCLUSÃO	32
7	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão pulmonar

A hipertensão pulmonar (HP) é uma doença caracterizada pelo remodelamento vascular pulmonar de forma progressiva e irreversível. Esse acarreta numa obstrução gradual do lúmen do vaso que tem consequências como o aumento da resistência vascular pulmonar e da pressão média da artéria pulmonar (mPAP) (HUMBERT et al., 2022).

É importante destacar que, em situações fisiológicas, a circulação pulmonar apresenta um sistema de baixa pressão e alto fluxo. Tais parâmetros como a resistência vascular pulmonar e mPAP são consideravelmente menores do que os encontrados na circulação sistêmica, sendo a pressão sistólica da artéria pulmonar de 15 a 20 mmHg, a pressão diastólica de 5 a 10 mmHg e a mPAP ≤ 20 mmHg (HUMBERT et al., 2022).

O diagnóstico da HP é realizado por avaliação hemodinâmica através de cateterismo cardíaco direito, sendo definido HP quando a mPAP ≥ 20 mmHg. Ademais, a doença pode ser subclassificada de acordo com características hemodinâmicas (tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros hemodinâmicos utilizado para diagnóstico de HP

Definição	Características hemodinâmicas
HP	mPAP ≥ 20 mmHg
HP pré-capilar	mPAP ≥ 20 mmHg Pressão capilar pulmonar ≤ 15 mmHg PVR ≥ 3 Woods
HP pós-capilar isolada	mPAP ≥ 20 mmHg Pressão capilar pulmonar ≥ 15 mmHg PVR ≤ 3 Woods
HP pré e pós capilar combinadas	mPAP ≥ 20 mmHg Pressão capilar pulmonar ≥ 15 mmHg PVR ≥ 3 Woods

Adaptada de CONDON *et al*, 2019. DC: Débito cardíaco; HP: hipertensão pulmonar; mPAP: pressão média na artéria pulmonar; PVR: resistência vascular pulmonar; mmHg: milímetros de mercúrio.

Seguindo as diretrizes do 6º Simpósio Mundial de HP, a doença pode ser classificada em 5 grupos conforme as características fisiopatológicas (tabela 2). A hipertensão arterial pulmonar (HAP) está no grupo 1, sendo a HAP idiopática a que apresenta maior incidência (HUMBERT et al., 2022).

Tabela 2: Grupos de HP, conforme divisão estabelecida no 6º Simpósio Mundial de HP

Classificação da hipertensão pulmonar
<p>Grupo 1 Hipertensão arterial pulmonar (HAP)</p> <p>1.1 HAP idiopática</p> <p>1.2 HAP Hereditária</p> <p>1.3 Induzida por drogas ou toxinas</p> <p>1.4 Associada com: Doença tecido conectivo; Infecção por vírus HIV; Hipertensão portal; Doença cardíaca congênita, esquistossomose</p> <p>1.5 HAP para pacientes tratados com bloqueadores dos canais de cálcio</p> <p>1.6 HAP com envolvimento de outra característica venosa/capilar; Doença pulmonar veno-oclusiva; Hemangiomas capilar pulmonar</p> <p>1.7 HAP persistente do recém nascido</p>
<p>Grupo 2 Hipertensão pulmonar decorrente de doença cardíaca esquerda</p> <p>2.1 Decorrente da insuficiência cardíaca com fração de ejeção do ventrículo esquerdo preservada</p> <p>2.2 Decorrente da insuficiência cardíaca com fração de ejeção do ventrículo esquerdo reduzida</p> <p>2.3 Doença cardíaca valvar</p> <p>2.4 Condições cardiovasculares congênito-adquiridas levando a HP pós-capilar</p>
<p>Grupo 3 Hipertensão pulmonar devido a doença pulmonar e / ou hipóxia</p> <p>3.1 Doenças pulmonares obstrutivas</p> <p>3.2 Doenças pulmonares restritivas</p> <p>3.3 Outras doenças pulmonares com padrão misto de obstrução/restricção</p> <p>3.4 Hipóxia sem doença pulmonar</p> <p>3.5 Desenvolvimento de doenças pulmonares</p>
<p>Grupo 4 Hipertensão pulmonar devido a obstrução da artéria pulmonar</p> <p>4.1 Hipertensão pulmonar tromboembólica crônica</p> <p>4.2 Outras obstruções da artéria pulmonar</p> <p>4.3 Sarcoma ou angiosarcoma</p> <p>4.4 Outros tumores malignos; Carcinoma renal, carcinoma uterino e outros</p>
<p>Grupo 5 Hipertensão pulmonar com mecanismos multifatoriais e /ou desconhecidos</p> <p>5.1 Doenças hematológicas</p> <p>5.2 Doenças sistêmicas</p> <p>5.3 Doença cardíaca congênita complexa</p>

Há estimativa de que a prevalência mundial da HP seja de aproximadamente 1% (HOEPER et al., 2016), porém esse registro parece ser subnotificado. A procura pelo serviço de saúde e a confusão do diagnóstico com outras doenças fazem com que a HP seja diagnosticada de forma tardia, dificultando o tratamento e piorando consideravelmente o

prognóstico. A maior prevalência da doença é em pessoas do sexo feminino, porém observa-se maior sobrevida nessa população também enquanto homens possuem um pior prognóstico da doença (PRINS AND THENAPPAN 2016).

1.2 Hipertensão arterial pulmonar

A HAP, classificada no grupo 1, é uma doença considerada rara, progressiva e sem cura que acomete aproximadamente 15 a 50 casos por milhão de adultos em países desenvolvidos (BESHAY et al., 2020). Porém, há indícios de que esses dados sejam subestimados, especialmente nos países subdesenvolvidos. No Brasil, não há registros epidemiológicos completos sobre a doença. Contudo, já é bem conhecido que a esquistossomose, um grande problema de saúde pública, tem relação direta com o desenvolvimento da HAP (LEBER et al., 2021). Portanto, a hipertensão arterial pulmonar merece atenção redobrada dos órgãos competentes.

Como descrito previamente, a HAP é uma doença com diagnóstico tardio devido aos seus sinais e sintomas serem semelhantes com os de outras doenças cardíacas e respiratórias. Isso pode levar a um atraso no seu diagnóstico e, conseqüentemente, uma piora no prognóstico e maior mortalidade. Pesquisa realizada com uma coorte canadense mostrou que a sobrevivência de pacientes com HAP associada com lúpus eritematoso foi de 70% após 5 anos da realização do diagnóstico. Os autores destacam que, para os pacientes que tinham lúpus eritematoso e desenvolveram a HAP, houve um aumento de 120% na mortalidade quando comparado aos que não desenvolveram HAP (CHEN et al., 2019).

Por outro lado, a realização do diagnóstico precoce, junto à maior eficácia e acesso ao tratamento, aumenta a sobrevida dos pacientes com HAP (KHANNA et al., 2021). De fato, KHANNA et al. (2021), mostraram, em metanálise, que a sobrevida dos pacientes com HAP aumentou três anos na última década.

1.3 Fisiopatologia da HAP

A HAP é definida por um aumento da mPAP associado ao remodelamento pulmonar e cardíaco. O remodelamento do parênquima pulmonar leva a uma obstrução gradual do

lúmen dos vasos e, conseqüentemente, a um aumento da resistência vascular. Os vasos mais acometidos por essas alterações são os de menor calibre como as arteríolas pré-capilares. Porém, vasos de maior calibre também podem ser atingidos pela evolução da piora hemodinâmica (HUMBERT et al., 2019; FAZAL et al., 2021).

Tem sido observado que o remodelamento vascular atinge as três camadas do vaso (adventícia, média e íntima), com a média merecendo destaque. O remodelamento dessa camada, que está associado ao aumento da mPAP, se dá pela proliferação celular descontrolada que induz um aumento da espessura e a redução na luz do vaso. Ademais, tais alterações também estão associadas ao aumento de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento (FAZAL et al., 2021).

Além da camada média, as outras camadas do vaso também são atingidas e acabam contribuindo para a disfunção vascular. De fato, o aumento da espessura da camada adventícia parece contribuir com a sinalização de respostas inflamatórias. Já a camada íntima, que pode ter sua espessura aumentada em até três vezes com a doença, tem sido bastante estudada (SHIMODA et al., 2013; FAZAL et al., 2021). Ao se proliferarem de forma anormal, as células endoteliais geram lesões plexiformes e, assim, pode surgir uma camada neointima que causa obstrução da luz do vaso (TUDER et al., 2016; FAZAL et al., 2021).

Esse aumento da resistência vascular pulmonar impõe uma maior pós-carga à ejeção do ventrículo direito (VD), induzindo uma adaptação morfofuncional dessa câmara cardíaca, visando suprir as demandas exigidas. Neste contexto, inicialmente ocorre hipertrofia concêntrica do VD para aumentar a força de contração e vencer a pós-carga aumentada. Contudo, a progressão da HAP com sustentação da resistência vascular pulmonar por longo tempo induz um remodelamento ventricular mal adaptativo que resulta na insuficiência do VD, situação definida como *Cor pulmonale* (BOURGEOIS et al., 2018; HUMBERT et al., 2019).

Todas as alterações morfofuncionais supracitadas têm sido relacionadas ao estresse oxidativo, uma condição em que há um desequilíbrio entre antioxidantes e oxidantes em favor da oxidação (XU et al., 2022). A importância das espécies reativas de oxigênio e do estado redox na patogênese e na fisiopatologia da HAP, por influenciarem na regulação do tônus vascular, merecem destaque.

1.4 Estresse oxidativo

A formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) é um evento natural, principalmente pelo transporte de elétrons na cadeia respiratória das mitocôndrias. Essas são formadas pela redução do oxigênio, visando a síntese de adenosina trifosfato (ATP). Em condições fisiológicas, as ROS desempenham papel no controle da função endotelial (SIES et al., 2020), já que o aumento das ROS pode ocasionar disfunção endotelial. Neste contexto, os antioxidantes atuam numa tentativa de estabilizar as ROS e evitar o estresse oxidativo, situação conhecida pelo aumento exagerado na formação de ROS e/ou pela redução na atividade/quantidade de antioxidantes. O estresse oxidativo prejudica a função vascular por estimular a proliferação celular e a vasoconstrição, situações associadas com um pior prognóstico em diversas doenças (SANDERS et al., 2007; CROSSWHITE et al., 2010; XU et al., 2022).

De fato, fatores vasoconstritores e vasodilatadores são encontrados em desequilíbrio na HAP (HUMBERT et al., 2019). Zimmer et al. (2021) demonstraram o perfil de algumas ROS e antioxidantes ao longo do tempo após indução da HAP com monocrotalina. Enquanto por um lado, no início, há uma adaptação dos antioxidantes pelo rápido aumento das ROS formadas, por outro lado, conforme a doença avança, é observado o desequilíbrio que favorece o estresse oxidativo e o remodelamento vascular (ZIMMER et al., 2021). Nessa condição, destacamos o óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador dependente do endotélio, que ao interagir com radical ânion superóxido forma peroxinitrito e, consequentemente, tem sua biodisponibilidade diminuída.

1.5 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é considerado um dos mais importantes vasodilatadores derivados do endotélio (HUYNH et al., 2006). Em condições fisiológicas, a enzima óxido nítrico sintase (NOS) recebe elétrons do fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) no seu domínio redutase e transfere para o domínio oxigenase, os elétrons interagem com o ferro do grupo heme e com tetrahydrobiopterina (BH₄), co-fator importante

para catalisar a reação de oxigênio com a L-arginina, produzindo L-citrulina e NO (DOS SANTOS et al., 2010).

O NO exerce uma variedade de funções biológicas como: vasodilatação, propriedades antiplaquetárias, antitrombóticas e anti-inflamatória na rede vascular (CANNON et al., 1998). Sua destacada função vasodilatadora, promovida pela sua difusão do endotélio para as células musculares lisas, é diminuída devido à sua grande reatividade com o ânion radical superóxido que culmina na redução da sua biodisponibilidade (WU et al., 2021). De fato, o ambiente oxidado diminui a produção de substratos essenciais à formação de NO, tornando a enzima NOS disfuncional, além de reduzir o tempo de atividade do NO (FÖRSTERMANN et al., 2017). Em outras palavras, a manutenção da biodisponibilidade do NO não depende apenas da sua síntese pela NOS, mas também pela inativação pelo ânion superóxido.

A redução da biodisponibilidade de BH4 representa uma das principais causas do desacoplamento da enzima NOS (ALP et al., 2004). O aumento da disponibilidade de ânion superóxido e a interação do superóxido com o NO podem levar à formação de peroxinitrito. O peroxinitrito oxida o BH4 que é um cofator essencial na formação do NO. A deficiência de BH4 leva a enzima NOS a produzir superóxido, ao invés de NO (LI et al., 2013; WU et al., 2021).

Em situações fisiológicas, a produção de peroxinitrito é baixa, porém em situações patológicas o aumento de 10 vezes na produção do superóxido levará à interação com NO e isso aumentará a produção do peroxinitrito em cerca de 100 vezes. O peroxinitrito induz danos celulares via peroxidação lipídica, inativação de enzimas e outras proteínas por oxidação e nitração, e também ativação de sinalização de estresse. Esses eventos podem culminar em apoptose dos cardiomiócitos (PACHER et al., 2007).

Como mencionado, o estresse oxidativo está diretamente associado à disfunção da enzima NOS, trazendo prejuízos para a regulação do tônus vascular. Além disso, o estresse oxidativo é um importante causador do desacoplamento da enzima NOS, levando a uma redução da biodisponibilidade de NO e favorecendo a disfunção endotelial. Essa redução já foi demonstrada em modelos experimentais de HAP, mas também em humanos (FUJI et al., 2016; GIAID et al., 1993).

1.6 Modelo de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina

A utilização de modelos experimentais com animais, muitas vezes, faz-se necessária para o aprofundamento mecanístico da doença, bem como para se testar novas alternativas terapêuticas. Para isso, esses devem mimetizar as principais características sintomáticas e histopatológicas de uma doença humana. Dentre os modelos experimentais, a utilização da monocrotalina, um composto alcaloide derivado da planta *Crotalaria spectabilis* (representado na figura 1) testado pela primeira vez em 1967, merece destaque por ser um método simples e fácil de realizar para induzir o remodelamento pulmonar, com aumento progressivo da mPAP e da resistência vascular pulmonar, características da HAP em humanos (SZTUKA et al., 2017; ZIMMER et al., 2020). De fato, em ratos, principal espécie animal utilizada para indução da HAP com monocrotalina, a injeção intraperitoneal única de 60 mg/kg tem sido eficaz na indução da doença (SZTUKA et al., 2017). Os efeitos da administração de monocrotalina em ratos são observados precocemente, sendo um modelo com rápida piora no prognóstico e que apresenta significativa taxa de mortalidade após 4 semanas experimentais (ZIMMER et al., 2020). Após uma semana, já estão presentes lesões endoteliais e inflamação perivascular, além do aumento da produção de ROS, mas sem dano oxidativo acentuado (ZIMMER et al., 2021). A partir da segunda semana, já é possível observar um remodelamento vascular, com aumento da resistência dos vasos pulmonares e estresse oxidativo/nitrosativo. Na terceira semana, é possível observar o espessamento das artérias, piora na reatividade vascular e indícios de insuficiência do VD. Do final da terceira semana experimental em diante, os animais apresentam sinais de caquexia e insuficiência cardíaca severa como, por exemplo, significativa redução do peso corporal, cianose, taquipnéia, taquicardia e letargia (ZIMMER et al., 2021; RUITER et al., 2013; MEYRICK et al., 1980). A monocrotalina possui alta toxicidade e pode induzir outras disfunções (doença veno-oclusiva, doença hepática, insuficiência renal, etc) que também contribuem para alta mortalidade após 4 semanas (DIGNAM et al., 2021).

A redução do peso corporal já pode ser observada a partir da sétima semana, porém ela se torna mais evidente após 14 e 21 dias. Essas alterações no peso são comumente associadas a alterações morfofuncionais, sendo também uma das formas de confirmar a instalação do quadro de HAP (ZIMMER et al., 2020).



Figura 1: Figura representativa da planta *Crotalaria spectabilis* (Disponível em <https://pt.wikipedia.org/wiki/Crotalaria>). Planta utilizada para produção de monocrotalina.

1.7 Tratamentos

Os tratamentos atuais têm como objetivo melhorar a qualidade de vida, melhorar a funcionalidade e aumentar a sobrevida. Para isso, fármacos que agem nas vias envolvidas na modulação da vasculatura pulmonar, inibindo a vasoconstrição e estimulando a vasodilatação, têm sido utilizados como tratamento convencional (PARIKH et al., 2019). Os principais fármacos utilizados, bem como seus mecanismos de ação, são apresentados na tabela 3. De fato, o tratamento convencional tem sido eficaz em reduzir o número de hospitalizações e a mortalidade, além de melhorar a qualidade de vida de parte dos pacientes com HAP (PITRE et al., 2022). Entretanto, muitos pacientes não são responsivos a essas medicações e, portanto, a busca por terapias alternativas que minimizem os males da HAP se torna muito relevante.

Tabela 3: Principais fármacos utilizados no tratamento da HAP e seus mecanismos de ação

Fármaco	Mecanismos de ação
Sildenafil e tadalafil	Inibidores da fosfodiesterase.
Riociguat	Estimulante da guanilato ciclase
Bosentan e Macitentan	Agonista não-seletivo do receptor da endotelina-1
Ambrisentan	Agonista seletivo do receptor A de endotelina
Epoprostenol e Treprostinil	Análogos sintéticos da prostaciclina
Selexipag	Agonista do receptor IP de prostaciclina

Fonte: Adaptado de PITRE et al., 2022

1.8 Terapias alternativas

A patogênese e a fisiopatologia da HAP estão associadas com o estresse oxidativo e a inflamação. O desenvolvimento de terapias para HAP, visando atenuar esses fatores, é um campo que vem sendo cada vez mais pesquisado. O tratamento com resveratrol, por exemplo, um polifenol com propriedades antioxidantes, tem se mostrado promissor como agente terapêutico na HAP por mitigar o remodelamento do parênquima pulmonar e do ventrículo direito (FERREIRA et al., 2020; XU et al., 2022).

Somado a isso, a redução da biodisponibilidade de NO parece ser um dos principais fatores da evolução da doença e um dos principais alvos dos tratamentos supracitados. Neste contexto, nosso grupo tem ampliado as pesquisas em busca de alternativas terapêuticas adjuvantes ao tratamento convencional da HAP. Lacerda et al. (2018) verificaram efeitos benéficos do pterostilbeno na progressão da HAP induzida por MCT pela redução do estresse oxidativo. A utilização do extrato de mirtilo, rico em pterostilbeno, também mostrou ter benefícios por reduzir a mPAP, além da redução do estresse oxidativo e melhora do estado redox pulmonar e do VD no modelo de HAP induzido por monocrotalina (TÜRCK et al., 2020). Outros compostos naturais têm sido testados e seus efeitos cardioprotetores importantes parecem estar associados com o metabolismo do NO. No mesmo sentido, SHI et al., 2018 mostraram que a utilização do antioxidante baicaleína minimizou o remodelamento

vascular nesse mesmo modelo experimental, evidenciando a participação do estresse oxidativo neste processo. Outra alternativa adjuvante que nosso grupo tem investigado é o papel cardioprotetor do exercício físico em modelo de HAP induzida por monocrotalina em ratos. Esses achados sugerem que o exercício físico é capaz de atenuar o espessamento da túnica média da artéria pulmonar e a hipertrofia do VD três semanas após administração de monocrotalina (RABBO et al., 2005; COLOMBO et al., 2011; COLOMBO et al., 2015).

Por suas propriedades antioxidantes já demonstradas o extrato de *P. albidus* se mostra uma promissora alternativa terapêutica nesse contexto.

1.9 *Pleurotus albidus*

A utilização de cogumelos como alimentos funcionais que podem ser aliados no tratamento de doenças cardiovasculares vem crescendo nos últimos tempos. (PELLEGRINO et al., 2022; SANDE et al., 2019). Os cogumelos da família *Pleurotus* podem ser facilmente encontrados em florestas temperadas e tropicais, e também podem ser cultivados em diferentes substratos. Estes cogumelos têm potencial gastronômico e apresentam propriedades medicinais relevantes (MOORE AND CHIU, 2001). Dentre eles, a espécie *Pleurotus albidus* (*P. albidus*), pode ser observado na figura 2 é muito comum na América do Sul, para a qual é rica em compostos fenólicos e, portanto, apresenta propriedade antioxidantes e potencial cardioprotetora (KIRSCH et al., 2016; BASU et al., 2010).

Nosso grupo tem ampliado as investigações com o cogumelo *P. albidus*, espécie que tem mostrado propriedades antioxidantes e anti-hipertensivas e, assim, grande potencial na prevenção e/ou tratamento da HAP (GAMBATO et al., 2016; REIS et al., 2019). Reis et al. (2019) mostraram que o extrato de *P. albidus* reduziu o estresse oxidativo e promoveu um relaxamento aórtico dependente de NO.

A utilização de diferentes substratos pode influenciar no conteúdo fenólico dos cogumelos. Gambato et al., 2016 buscaram investigar a importância da utilização de diferentes substratos para a produção dos cogumelos e como os substratos influenciam a produção de compostos antioxidantes, como conteúdos fenólicos. O substrato utilizado para o cultivo do *P. albidus* foi de serragem de pinus com cascas de maçã que, segundo os autores, gerou melhor rendimento quando comparado a outros tipos de substratos utilizados, como casca de arroz e restos de uva, por exemplo. Além disso, esse substrato mostrou influência na

composição química, presença de compostos fenólicos e a atividade antioxidante (GAMBATO et al., 2016).



Figura 2: Cogumelo *Pleurotus albidus* (Disponível em https://en.wikipedia.org/wiki/Pleurotus_albidus).

Sendo assim, uma vez que o *P. albidus* tem apresentado grande potencial na prevenção e no tratamento de alguns distúrbios por atenuar o estresse oxidativo e a restaurar a biodisponibilidade do NO, torna-se de grande relevância avaliar sua influência no modelo de HAP induzida por monocrotalina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do extrato de cogumelo *P.albidus* na reatividade vascular da artéria pulmonar e no estresse oxidativo do tecido pulmonar de ratos Wistar com hipertensão arterial pulmonar.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a reatividade vascular de anéis de artéria pulmonar de ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina;
- Analisar o papel do óxido nítrico sintase na reatividade vascular;
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* do extrato de cogumelo em homogeneizado de pulmão.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico de *Pleurotus albidus*

Foi utilizada a linhagem 88F de *Pleurotus albidus* (MIUCS 1580), pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassas da Universidade de Caxias do Sul/RS e depositada na seção micológica do Herbário da Universidade de Caxias do Sul (UCS/MUSIC) (ROSA; WASUM; DILLON, 2016).

Os basidiomas foram cultivados em sacos de polipropileno, contendo 1,5 kg de meio de cultivo (bagaço de uva *Vitis labrusca*, 50%; serragem de *Pinus* sp. 44%; farelo de trigo, 5 %; CaCO₃, 1,0 % e água destilada para a obtenção de 66 % de umidade). Primeiramente, os sacos foram inoculados com todo o conteúdo de placas de Petri com micélio do fungo previamente crescido, sendo posteriormente armazenados em local com temperatura controlada (28°C). Quando observada colonização total do meio de cultivo e presença de primórdios de basidiomas, os sacos foram perfurados com bisturi e levados para estufa com temperatura ambiente (entre 20 e 30°C) e umidade relativa do ar entre 70 a 90% (GAMBATO et al, 2016).

Os cogumelos foram coletados e então secos em desidratador (Funkitchen®) durante 8 h, a 50°C, triturados em moedor (Cadence®) e armazenados a 4°C. Após isso, 10 g de cogumelo em pó seco e 100 ml de etanol 70% foram colocados em um sistema de refluxo por 30 minutos a 100°C. Posteriormente, a mistura foi filtrada sob vácuo e a fração solúvel em etanol foi em um evaporador rotativo (modelo 803, Fisatom). O resíduo insolúvel em etanol foi re-extraído com 100 ml de água por uma hora no mesmo sistema. Ao final, os extratos foram agregados e liofilizados até que o extrato seco fosse obtido (GAMBATO et al., 2018).

Para realização dos experimentos de reatividade vascular, foi preparada uma solução principal de *Pleurotus albidus* (80 mg/ml) usando solução Tyrode como solvente. Posteriormente, a solução foi diluída nas concentrações alvo do estudo: 0,0047 mg/ml, 0,0094 mg/ml, 0,0188 mg/ml, 0,0376 mg/ml, 0,075 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,3 mg/ml e 0,6 mg/ml. A solução com *P. albidus* foi adicionada na cuba a cada dois minutos, tempo necessário para estabilização dos segmentos e registro dos achados.

3.2 Bioética com os animais

O estudo desenvolvido seguiu a Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008, que estabelece normas para a Prática Didático-Científica da Vivisseccção de animais; os Princípios Éticos na Experimentação Animal, formulados pelo CONCEA, assim como aquelas normas contidas nas Diretrizes da Prática de Eutanásia, formulada em 2013 pela mesma instituição. Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob o número de homologação 40049.

3.3 Animais

Foram utilizados 25 ratos machos Wistar, com peso aproximado de 200 ± 20 gramas advindos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CREAL – UFRGS). Os animais foram mantidos em caixas plásticas com medidas de 400 x 340 x 160 mm, totalizando quatro animais por caixa. Os animais foram mantidos no biotério do CREAL, localizado no Campus do Vale da

UFRGS e mantidos em ambiente com temperatura controlada (21 – 25°C), ciclo “claro-escuro” de 12 horas e umidade relativa de 70%. Água e ração comercial foram ofertadas.

3.4 Grupos experimentais

Foram estabelecidos 2 grupos experimentais:

Grupo controle – CTRL (n =13) → animais que receberam a injeção de solução salina e que foram eutanasiados após 21 dias do início do protocolo experimental;

Grupo monocrotalina – MCT (n =12) → animais que receberam injeção de monocrotalina e que foram eutanasiados 21 dias após o início do protocolo experimental;

3.5 Indução de HAP através da administração de monocrotalina

Os animais receberam uma injeção única de salina 0,9% (pH 7,4) ou monocrotalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) na dose de 60 mg/kg intraperitonealmente. A diluição da MCT, sendo 60 mg para 1 mL de volume final, foi realizada em 0,5 mL de HCl 1N. Após solubilizar, o pH foi ajustado até atingir 7,4 com adição de NaOH 1 N e, para complementar o volume final foi acrescentado NaCl 0,9% (FARAHMAND; HILL; SINGAL, 2004).

3.6 Protocolo experimental

Inicialmente, os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos, controle (CTRL) ou monocrotalina (MCT) conforme descrito acima. Esses tiveram o peso aferido no início, aos 7 e aos 21 dias de experimento. Os animais permaneceram no biotério do CREAL durante o protocolo e apenas no dia da eutanásia foram transferidos para o Instituto de Ciências Básicas de Saúde (ICBS) da UFRGS para que fossem eutanasiados.

Ao final do protocolo, os animais foram anestesiados com quetamina (90 mg/kg i.p.) e xilazina (10 mg/kg i.p.), conforme o Guia de Anestesia e Analgesia para Ratos e

Camundongos, 2016 do CREAL /UFRGS e eutanasiados por decapitação em guilhotina manual, esse procedimento foi realizado em sala separada para minimizar o nível de estresse dos animais. Feito isso, eles foram dissecados para coleta da artéria pulmonar e dos pulmões.

3.7 Reatividade vascular

Imediatamente após a eutanásia dos animais, o tórax foi aberto, e a artéria pulmonar foi cuidadosamente removida e imersa em uma placa de Petri contendo solução tampão de Ringer-Henseleit, composta por: NaCl 115 mM, CaCl₂ 2,5 mM, KCl 4,6 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄·7H₂O 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM, glicose 11,1 mM, Na₂EDTA 3 mM. A artéria foi então manipulada para retirada do tecido conjuntivo e adiposo e preparada um único anel de aproximadamente 2 a 3 mm. Feito isso, o segmento foi adaptado ao aparato experimental. Os anéis foram montados passando-se dois ganchos de aço inoxidável através do lúmen do vaso, um deles conectado a uma base fixa e outro a um transdutor de tensão isométrica (AQCAD 2.0.5, AVS, São Paulo, SP), possibilitando a mensuração da tensão desenvolvida pelos anéis.

Cada anel de artéria foi colocado em cubas individuais contendo 10 ml de solução tampão de Ringer-Henseleit mantida aquecida a 37°C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂), mantendo o pH estável em 7,4. Conforme a figura 4 A tensão dos anéis foi mantida constante em 1,5 gf durante 60 minutos para estabilização do tônus basal de repouso.

Após a estabilização, foi realizada a administração de cloreto de potássio (KCl, 60 mM) ao banho. O KCl foi mantido na cuba por um período de 30 minutos, tempo suficiente para que se observasse um platô de contração do vaso. Foram considerados viáveis para o experimento os vasos que apresentaram contração isométrica superior a 0,5 gf quando banhados com KCl. Posteriormente, foram realizadas 3 lavagens subsequentes com solução tampão de Ringer-Henseleit ao longo de 30 minutos, tempo suficiente para que ocorresse o retorno das condições de repouso dos segmentos avaliados.

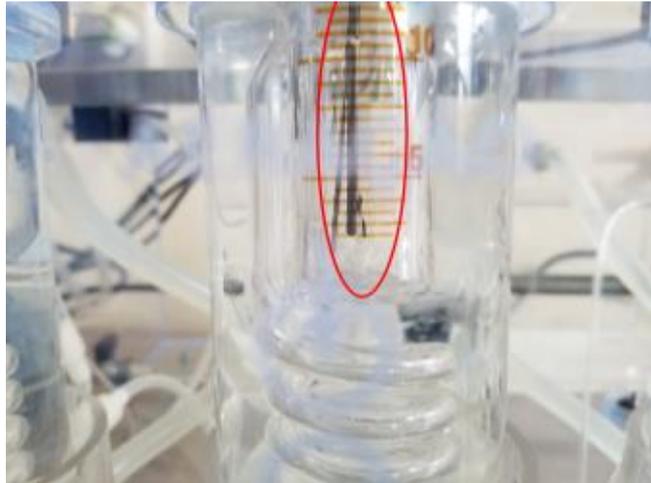


Figura 3: Anel de artéria pulmonar no sistema de banho de órgãos isolado. Fotografia obtida no estudo (imagem do próprio autor).

Após novo período de estabilização, foi realizada uma pré-contração com dose única de fenilefrina (Phe, 10^{-6} M). O tempo de 4 minutos foi padronizado para que se obtivesse um platô de contração. O valor da contração com Phe serviu como referência de contração máxima (100%) e foi utilizado como ponto de partida para as intervenções vasodilatadoras utilizadas no presente estudo. A integridade funcional do endotélio vascular foi testada com dose única de acetilcolina (Ach, 10^{-5} M) para relaxamento da musculatura lisa (realizado apenas no protocolo 2) (Figura 5).

Com o objetivo de avaliar a resposta vasodilatadora do extrato de *Pleurotus albidus* foi realizada uma curva utilizando diferentes concentrações desse cogumelo. Após uma pré-contração com Phe (10^{-6} M), doses crescentes de extrato de *Pleurotus albidus* (0,0047 - 0,0094 - 0,0188 - 0,0376 - 0,0750 - 0,15 - 0,3 - 0,6 mg/mL) foram adicionadas respeitando intervalo de 2 minutos entre elas (Figura 4).

Para elucidarmos a participação do NO na resposta induzida pelo extrato de *P. albidus*, foi utilizado o Nw-nitro-arginina-metil-ester (LNAME) como um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase. Após a avaliação da integridade funcional do endotélio, as artérias foram pré-incubadas com LNAME (10^{-5} M) por um período de 30 minutos. Feito isso, foi realizada uma pré-contração com Phe (10^{-6} M), seguida de doses crescentes de extrato de *P. albidus*, conforme descrito no primeiro experimento (Figura 5)

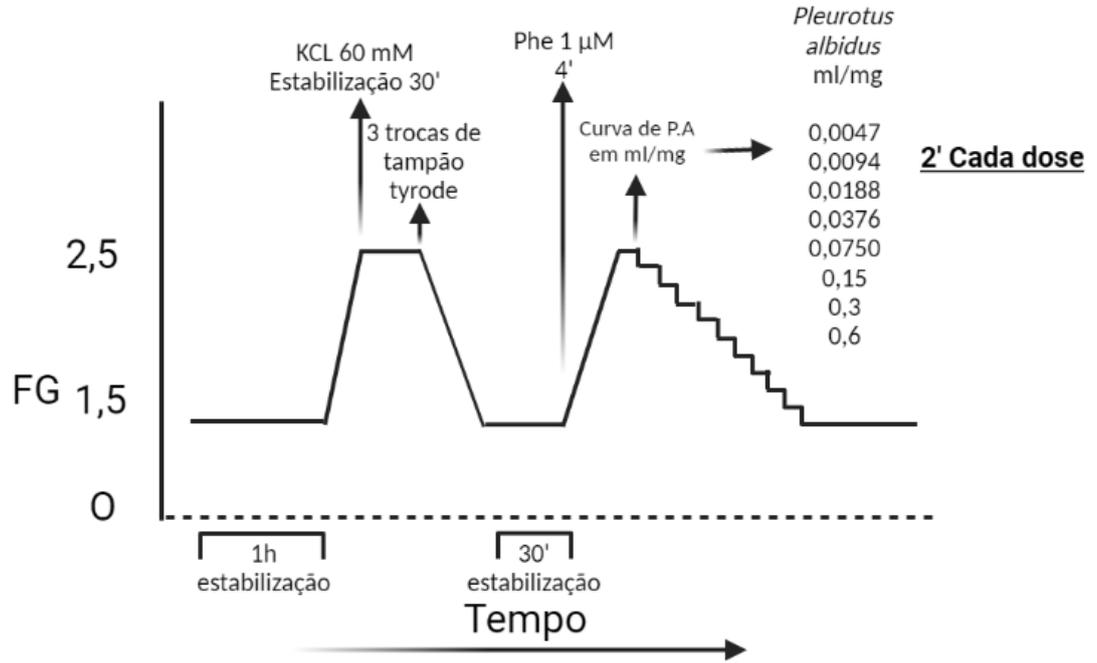


Figura 4: Registro representativo do protocolo padrão para testagem da viabilidade dos vasos e da resposta ao extrato de *Pleurotus albidus*.

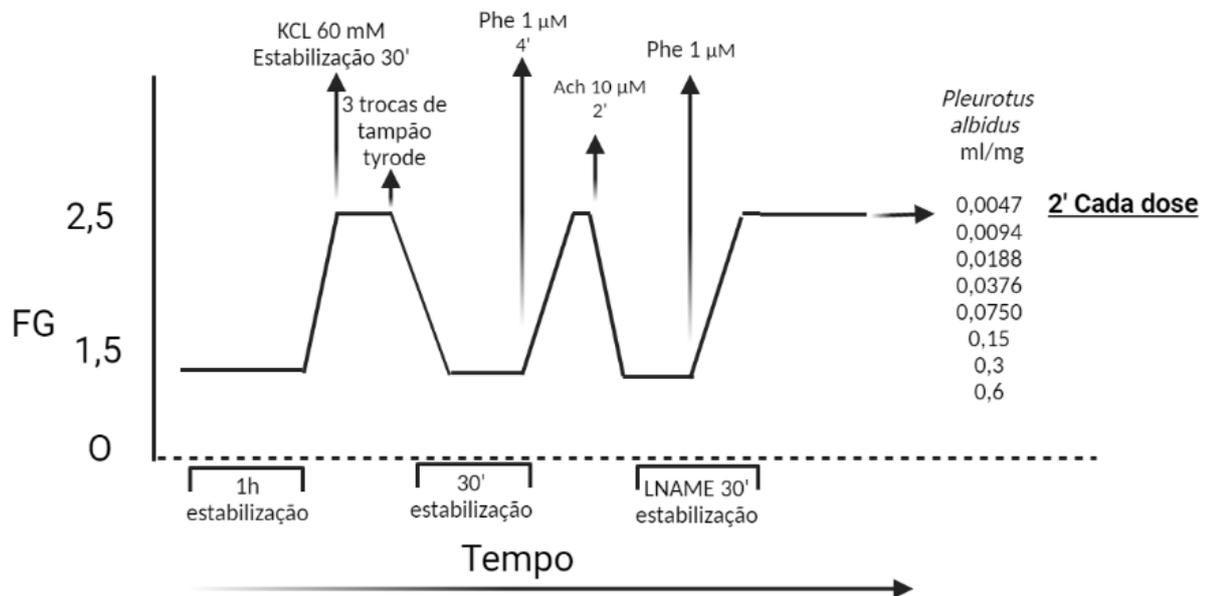


Figura 5: Registro representativo da resposta vasodilatadora induzida pelo extrato de *Pleurotus albidus* em anéis de artérias pulmonares pré-incubadas com LNAME.

3.8 Preparo do pulmão para análises bioquímicas

Amostras do pulmão direito dos animais foram homogeneizadas por 40 segundos com homogeneizador Ultra- Turrax (OMNI Tissue homogenizer, OMNI Internacional, EUA) na presença de 1,15% de KCl (5 ml/g de tecido) e 100 mM de fenilmetil sulfonil fluoreto. As amostras foram centrifugadas (20 minutos a 10000 x g a 4°C) e o sobrenadante foi coletado para realização das análises. Posteriormente, as amostras foram incubadas com FeCl₂, 2,5 µL (preparação: 5,6 µL em 10 mL de água deionizada – 0,02Mm) e 2,5 µL de H₂O₂ (preparação: 5,6 µL em 1 mL de água deionizada – 50 Mm) e ácido ascórbico para induzir o estresse oxidativo (sistema de geração de radicais hidroxila) por 30 minutos a 37°C (HALLIWELL; GUTTERIDGE 1990). A quantificação de proteínas das amostras foi determinada conforme o método de Lowry, usando solução de albumina de soro bovino como padrão (LOWRY et al., 1951).

3.9 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O TBARS foi medido conforme descrito previamente por BUEGE AND AUST 1978. Neste método, o ácido tiobarbitúrico (TBA) reage com os produtos da peroxidação lipídica, produzindo compostos que são medidos à 535 nm. Realizado em meio ácido com aquecimento. Os resultados de TBARS foram expressos como nmol/mg de proteína.

3.10 Espécies reativas de oxigênio totais

A oxidação do composto diacetato de 2,7 diclorofluoresceína (DCFH-DA) à 2,7 diclorofluoresceína (DCF) na presença das amostras foi usada para determinar o total de espécies reativas, como descrito por LEBEL et al, 1992. Os resultados foram expressos como pmol de DCF/mg de proteína.

3.11 Sulfidrilas

A quantificação de sulfidrilas totais das amostras foi efetuada utilizando 5,5' ditiobis- (ácido 2- nitrobenzóico) DTNB 10 mM adicionado a 15 µL de homogeneizados de pulmão e incubados por 30 minutos, em ambiente escuro. A absorbância (formação de 2-

nitro-5-tiobenzoato (TNB)) foi medida espectrofotometricamente a 412 nm (Anthos Zenyth 200 RT, Biochrom, Reino Unido), e os resultados foram expressos como nmol TNB/mg de proteína (AKSENOV *et al.*, 2001).

3.12 Descarte de resíduos

As carcaças dos animais mortos e os demais resíduos biológicos foram acondicionados em sacos brancos, identificados e levados ao biotério setorial do ICBS - UFRGS, local onde há um freezer onde foram acondicionadas as carcaças. Após, os técnicos do CREAL ficaram responsáveis por orientar o recolhimento pela empresa especializada em serviço de coleta de materiais biológicos.

O descarte de materiais perfurocortantes que tinham contato com líquidos corpóreos dos animais como agulha, seringa, foi realizado em caixa de papelão amarela conforme protocolo do Ministério de Saúde. Materiais tóxicos foram usados na capela e encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para sua correta eliminação. Os materiais que não eram perfurocortantes – papel, luvas, máscaras, etc. – foram descartados em lixo contaminado.

3.13 Análises estatísticas

As análises foram realizadas usando o software GraphPad Prism 6.0. Para analisar os dados de peso corporal e da reatividade vascular foi utilizado o teste de ANOVA de duas vias. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os resultados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância de duas vias (ANOVA 2-way) e complementadas pelo teste de Student-Newman-Keuls os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Para as análises bioquímicas *in vitro* do tecido pulmonar foi utilizado o teste t de *Student*. Os resultados foram considerados significantes quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Peso corporal

O peso corporal dos animais é mostrado na Tabela 4. Observamos um aumento significativo no peso corporal ao longo do tempo em ambos os grupos, sendo o peso final no grupo MCT significativamente menor (12%) em relação ao CTRL. Os animais do grupo MCT apresentaram sinais de letargia, cianose e taquipneia.

Tabela 4: Evolução temporal do peso em gramas (g) dos grupos CTRL e MCT em três diferentes momentos após a injeção de monocrotalina.

Dia	CTRL	MCT
0	222 ± 21	205 ± 14
7	275 ± 23 (↑24%) a	255 ± 18 (↑25%) a
21	376 ± 31 (↑69%) a b	332 ± 41 (↑63%) a b*

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão da média. CTRL = grupo controle; MCT = grupo tratado com monocrotalina. a Diferença significativa do próprio grupo em relação ao início do experimento ($p < 0,0001$). b Diferença significativa do próprio grupo em relação aos 7 dias ($p < 0,0001$) * Diferença significativa em relação ao grupo CTRL 21 dias ($p < 0,05$).

4.2 Reatividade vascular

4.2.1 Avaliação da resposta contrátil induzida por KCl e fenilefrina

A viabilidade dos vasos foi comprovada pela resposta contrátil inicial à administração de KCl (60mM). Essa foi capaz de aumentar em média 50% a força contrátil dos vasos. Após

nova estabilização, a administração de fenilefrina (1 μ M) induziu resposta contrátil muito semelhante à induzida pelo KCl, comprovando a viabilidade do vaso para experimentação. Foram excluídos do estudo os vasos que não responderam ao KCl e/ou que a administração de fenilefrina não induziu pelo menos 50% da resposta contrátil observada pelo KCl. Desta forma, 5 vasos do grupo CTRL e 8 do grupo MCT foram excluídos do estudo. Na tabela 5, pode-se observar a resposta contrátil induzida por KCl (60 mM) e Phe (1 μ M). Podemos observar que houve um aumento estatisticamente significativo a adição das doses de 60 mM de KCl e 1 μ M Phe em relação ao basal.

Tabela 5: Resposta contrátil induzida por KCl (60 mM) e fenilefrina (1 μ M) em anéis de artérias pulmonares dos grupos CTRL e MCT incubadas com LNAME ou não.

	CTRL (n=6)	MCT (n=5)	CTRL-LNAME (n=7)	MCT-LNAME (n=7)
Estabilização (gf)	1,48 \pm 0,02	1,51 \pm 0,05	1,50 \pm 0,05	1,54 \pm 0,05
KCl (gf)	2,00 \pm 0,03 *	2,12 \pm 0,07 *	2,43 \pm 0,41 *	2,51 \pm 0,18 *
Phe (gf)	2,40 \pm 0,29 *	2,20 \pm 0,22 *	2,44 \pm 0,34 *	2,59 \pm 0,24 *

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão da média. * variação significativa em relação à estabilização p<0,05. CTRL = grupo controle; MCT = grupo tratado com monocrotalina; gf = grama força.

4.3 Relaxamento com *P. albidus*

Ao comprovarmos a viabilidade vascular e induzirmos a pré-contração com fenilefrina, partimos para análise da resposta vasodilatadora do extrato de *P. albidus*. A figura 6 mostra o relaxamento progressivo dos anéis de artéria pulmonar quando administradas doses crescentes de extrato no grupo CTRL. Já o grupo MCT apresentou menor relaxamento, sendo esse significativamente menor nas concentrações acima de 0,075 mg/mL de *P. albidus* em relação ao CTRL.

Essa menor resposta vasodilatadora ao *P. albidus* no grupo MCT também pode ser observada ao analisarmos as áreas sob as curvas de relaxamento na figura 7. Essa mostra uma maior área no grupo MCT em relação ao CTRL (p=0,0053). Ou seja, uma menor capacidade de relaxar o vaso após contração prévia com fenilefrina.

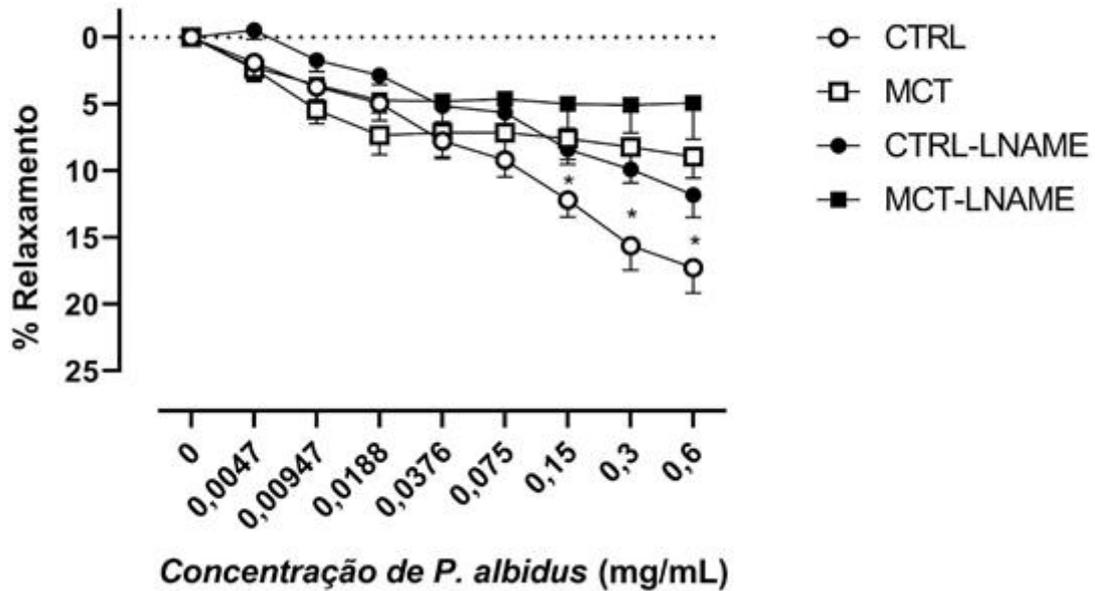


Figura 6 Curva de relaxamento induzido pelo extrato de *Pleurotus albidus* em anéis de artéria pulmonar previamente incubados com L-NAME ou não e contraídos com fenilefrina (1 μ M). * Menor relaxamento do grupo MCT e CTRL-LNAME em relação ao grupo CTRL na respectiva dose experimental $p < 0,05$.

4.4 Influência do óxido nítrico sintase no relaxamento induzido pelo *P. albidus*

Buscando verificar se a resposta vasodilatadora do extrato estava relacionada com o NO, utilizamos o inibidor inespecífico das enzimas sintetizadoras desse vasodilatador dependente do endotélio (LNAME 100 μ M). A figura 6 mostra que a incubação com L-NAME reduziu significativamente a resposta vasodilatadora do *P. albidus* no grupo CTRL, tornando essa muito semelhante a do grupo MCT. Somado a isso, o LNAME não variou significativamente o relaxamento do grupo MCT, sugerindo que esse, ao contrário do grupo CTRL, depende menos do NO para regular o tônus da artéria pulmonar.

Esses resultados também podem ser observados pelas áreas sob as curvas mostradas na figura 7, confirmando a influência do óxido nítrico na resposta vasodilatadora induzida pelo *P. albidus*.

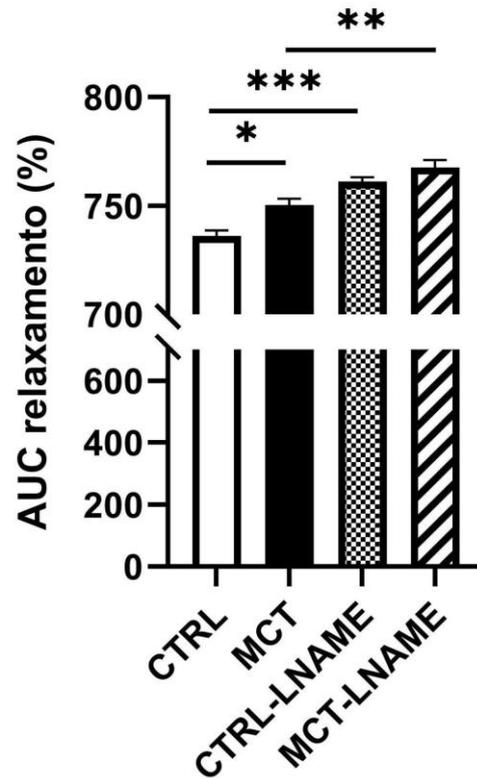


Figura 7 Área sob a curva de relaxamento de anéis de artérias pulmonares expostos a diferentes concentrações de extrato de *P.albidus*. * $p=0,01$; ** $p=0,002$; *** $p<0,001$.

4.5 Estresse oxidativo em homogeneizado de pulmão

Os níveis basais de lipoperoxidação foram significativamente maiores no grupo MCT em relação ao controle (figura 8). Ao estimularmos a formação de espécies reativas de oxigênio *in vitro*, os níveis de lipoperoxidação não apresentaram variações significativas.

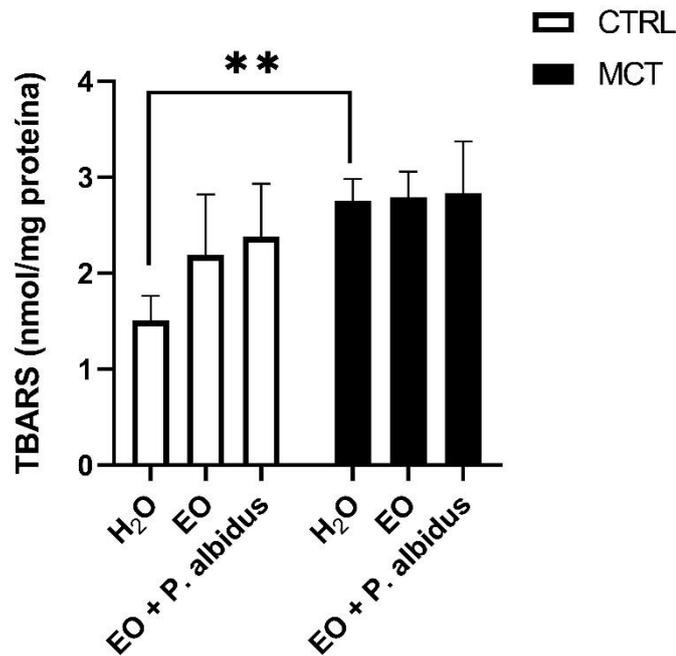


Figura 8 Lipoperoxidação pelo método de TBARS em homogeneizado de tecido pulmonar de ratos CTRL e MCT incubadas com extrato de *Pleurotus albidus* (0,3 ml/mg) ou água destilada e expostas ao sistema gerador de radicais livres. ** Diferença significativa *P. albidus* H₂O em relação ao CTRL H₂O (p = 0,007).

Já os níveis de ROS totais não diferiram significativamente entre os grupos experimentais em condição basal, após indução do estresse oxidativo *in vitro* ou pela adição do *P. albidus* (Figura 9).

A figura 10 mostra os níveis de sulfidrilas nas diferentes condições experimentais. A indução do estresse oxidativo *in vitro* reduziu significativamente os níveis de sulfidrilas no grupo CTRL (p=0,0172), efeito não atenuado pelo extrato de cogumelo. Já no grupo MCT, a indução do estresse e a incubação com extrato de *P. albidus* não alteraram significativamente os níveis das sulfidrilas.

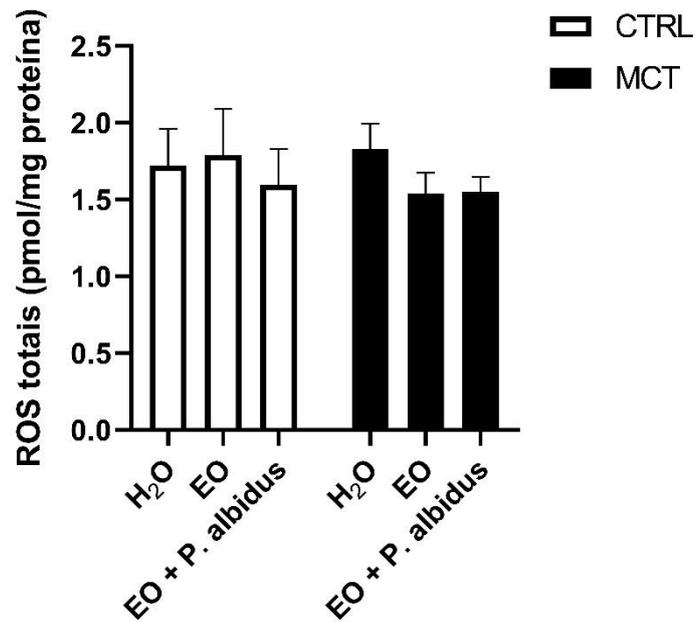


Figura 9 Níveis de espécies reativas de oxigênio totais em homogeneizado de tecido pulmonar de ratos CTRL e MCT incubados com extrato de *Pleurotus albidus* (0,3 ml/mg) ou água destilada e expostos ao sistema gerador de radicais livres.

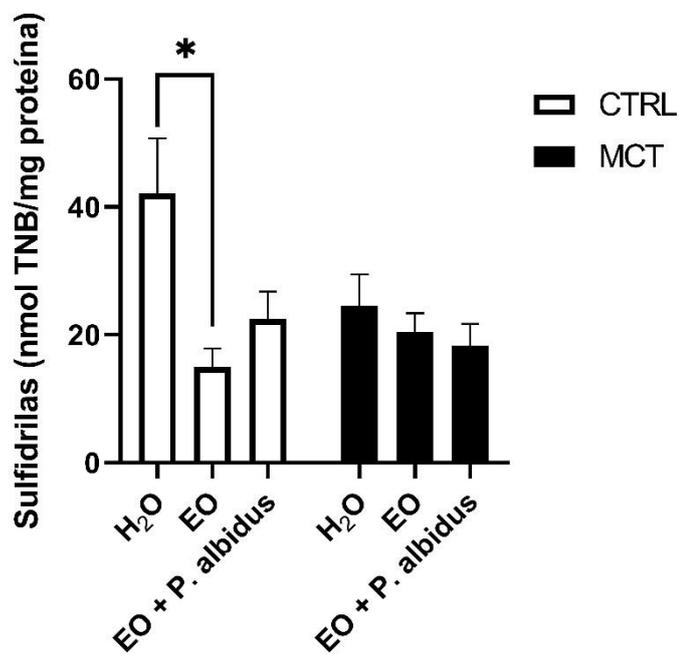


Figura 10 Níveis de sulfidrilas em homogeneizado de tecido pulmonar de ratos CTRL e MCT incubados com extrato de *Pleurotus albidus* (0,3 ml/mg) ou água destilada e expostos ao sistema gerador de radicais livres. * Diferença significativa do CTRL EO em relação ao CTRL H₂O ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho apresenta de forma inédita o efeito vasodilatador do extrato de *Pleurotus albidus* em artérias pulmonares de ratos Wistar, assim como a contribuição do óxido nítrico nessa resposta. Ainda, a menor resposta vasodilatadora nos animais com HAP após 21 dias da indução com monocrotalina foi associada a menor dependência do NO para regulação do tônus vascular e à maior lipoperoxidação, sugerindo que o estresse oxidativo é um dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da doença.

Já é bem conhecido que pacientes com hipertensão pulmonar apresentam redução do peso corporal com a progressão da doença (HESSEL *et al.*, 2006). Pacientes muito magros e/ou com grande perda de peso corporal são mais susceptíveis ao agravamento da doença, sendo, portanto, o peso um marcador de sobrevida (FEKRI *et al.*, 2018; ZAFRIR *et al.*, 2013). Por outro lado, apesar do sobrepeso ser agravante para doenças cardiovasculares em geral, pacientes com índice de massa corporal ≥ 30 kg/m² têm menor mortalidade por HP por apresentarem maior tolerância à inflamação sistêmica e uma maior reserva metabólica (ZAFRIR *et al.*, 2013).

Em modelos experimentais de HAP, a perda de peso ou o menor ganho de peso corporal têm sido comumente relatados (LUDKE *et al.*, 2010; ZIMMER *et al.*, 2016; ZIMMER *et al.*, 2021; RABBO *et al.*, 2005). No presente trabalho, observamos que o grupo MCT teve menor peso corporal quando comparado ao CTRL 21 dias após administração de monocrotalina, corroborando achados prévios que mostraram atenuação do peso com a progressão da HAP (COLOMBO *et al.*, 2011; ZIMMER *et al.*, 2017; ZIMMER *et al.*, 2021). Conzatti *et al.* (2016) demonstraram um menor ganho de peso em animais que receberam monocrotalina quando comparados ao grupo controle a partir do 14^o dia, corroborando outros estudos prévios do nosso grupo de pesquisa que também mostraram redução no ganho de peso corporal duas semanas após administração de monocrotalina, tornando-se mais pronunciada da terceira semana em diante, período em que o remodelamento obstrutivo da vasculatura pulmonar e a disfunção ventricular direita se tornam bem pronunciados (TÜRCK *et al.*, 2019; LACERDA *et al.*, 2018; ZIMMER *et al.*, 2017). Verificamos, no presente estudo, que o menor ganho de peso foi associado com sinais de letargia, cianose e taquipneia no grupo MCT em relação ao controle, corroborando achados prévios de Colombo *et al.* (2011). Cabe destacar que na maioria desses estudos foram utilizados ratos Wistar adultos jovens (45-60

dias de vida). Portanto, são animais que ainda estão em fase de crescimento e não deixaram de ganhar peso ao longo do tempo, mas passaram a ganhar menos peso após receberem monocrotalina.

Junto à atenuação no ganho de peso, o aumento da espessura das paredes das arteríolas e o maior infiltrado inflamatório são características observadas nos animais com HAP após administração de monocrotalina (Siqueira et al., 2015). Neste sentido, HESSEL *et al.*, 2006, relataram que o aumento da resistência vascular pode ser atribuído a um aumento da espessura de arteríolas pulmonares. Corroborando esses achados, Seolin et al. (2018), também mostraram um aumento das células inflamatórias e da espessura da parede da artéria pulmonar em ratos Wistar que receberam monocrotalina. Tais alterações já podem ser observadas a partir da segunda semana após administração do alcaloide, momento em que a atenuação do peso dos animais passa a ser evidente (ZIMMER et al., 2021).

Portanto, o modelo de HAP com a administração de monocrotalina (60 mg/kg, i.p.) em ratos Wistar é reprodutível e tem sido amplamente utilizado (TÜRCK *et al.*, 2019; LACERDA et al., 2018; ZIMMER et al., 2017), por induzir alterações histopatológicas no parênquima pulmonar que se correlacionam de forma inversa com o peso corporal (SIQUEIRA et al., 2015, COLOMBO et al., 2011; SEOLIN et al., 2018; ZIMMER et al., 2018), mimetizando a fisiopatologia dessa doença

Além do remodelamento pulmonar, o ventrículo direito também hipertrofia de forma compensatória, a partir da segunda semana após administração de monocrotalina, visando à manutenção do débito cardíaco após significativa elevação da pós-carga (PRINS; THENAPPAN, 2016). Essa hipertrofia cardíaca está relacionada com a progressão para piora funcional do VD nos modelos experimentais de HAP, quer seja pela administração de monocrotalina, utilizada no presente trabalho, ou pela hipóxia (ZIMMER et al., 2021; VANDERPOOL et al., 2022; HAJJ et al., 2020; ZELT et al., 2019).

Assim como os achados histopatológicos clássicos observados após administração de monocrotalina (60 mg/kg, i.p.) em ratos Wistar, parâmetros funcionais do ventrículo direito têm sido amplamente documentados e estritamente relacionados com as alterações estruturais. Em ratos Wistar machos que receberam dose única de monocrotalina (60 mg/kg, i.p.), a insuficiência do VD é observada quase na totalidade após 28 dias (TÜRCK et al., 2019; LACERDA et al., 2018; ZIMMER et al., 2017), apesar de sinais de piora da função ventricular já serem registrados precocemente (ZIMMER et al., 2021; LIMA-SEOLIN et al., 2018). De fato, tem sido mostrada uma significativa redução no tempo de aceleração do fluxo através da artéria pulmonar e na excursão sistólica do anel tricúspide em direção ao ápice

(TAPSE) em ratos 21 dias após administração de monocrotalina (PRISCO et al. 2021; TÜRCK et al., 2020). Junto a isso, a monocrotalina induz uma proeminente redução da fração de ejeção e grande aumento da pressão diastólica final e pressão sistólica do ventrículo direito, parâmetros indicativos de insuficiência do VD (PRISCO et al. 2021, LIMA-SEOLIN et al., 2018; ZIMMER et al., 2021)

Portanto, amparados pelos achados prévios, assumimos a redução do peso corporal e os sinais de letargia, cianose e taquipneia observados no presente trabalho como indicativos da instalação e da progressão da HAP após administração de monocrotalina. Com isso, partimos para análise da reatividade na artéria pulmonar nessa doença e, de forma inédita, avaliamos o efeito do extrato de *Pleurotus albidus* sobre este vaso *in vitro*.

Antes de qualquer coisa, a utilização de vasos isolados para pesquisa necessita de testes prévios para certificação da sua funcionalidade. Entretanto, são poucos os trabalhos que testaram a reatividade da artéria pulmonar e, desses, raríssimos mostraram os testes de integridade do vaso.

A incubação dos vasos com cloreto de potássio tem sido classicamente recomendada para se testar sua funcionalidade (PEÇANHA et al., 2008). O mecanismo envolvido na contração com o KCl ocorre por alterações no potencial de membrana. O aumento do potássio extracelular (inibe a saída de K do meio intracelular) causa um estado de despolarização, abertura de canais de Ca²⁺ dependentes da voltagem, aumento do cálcio intracelular e vasoconstrição (BÜLBRING AND TOMITA, 1987; GANITKEVICH & ISENBERG, 1991). Contudo, não há uma padronização no que diz respeito à concentração de KCl a ser utilizada para esse fim, sendo essa bastante variável entre os estudos (ROCHA *et al.*, 2015; MACIEL et al., 2015). Delbin et al. (2009) e Maciel et al. (2015) testaram a funcionalidade dos vasos utilizando KCl na concentração de 80 mM. Já Peres et al., 2012, observaram vasoconstrição significativa em artérias pulmonares utilizando KCl na concentração de 75 mM. Concentrações mais altas de KCl (120 mM) foram utilizadas em estudos para induzir aumento de 100% da força contrátil em relação ao estado basal. Já no presente trabalho, os anéis de artérias pulmonares foram testados com KCl 60 mM, concentração conhecida por ser suficiente para induzir uma resposta contrátil dos vasos em 50% em relação ao estado basal (REIS 2012). Adicionalmente, a funcionalidade dos vasos foi confirmada no presente estudo pela administração de fenilefrina (1µM), concentração efetiva em induzir vasoconstrição semelhante à estimulada pelo KCl. Além de ser útil para analisar a funcionalidade dos vasos, a vasoconstrição com fenilefrina também serve como padrão (pré-contração) para se testar substâncias com potencial vasodilatador (PEÇANHA 2008).

Neste contexto, no presente estudo avaliamos a influência do extrato de cogumelo *Pleurotus albidus* sobre anéis de artérias pulmonares de ratos Wistar pré-contraídas com fenilefrina. Observamos que o *P. albidus* promoveu vasodilatação progressiva no grupo CTRL, resposta atenuada no grupo MCT. Esses achados vão ao encontro dos resultados de trabalho prévio do nosso grupo em que foi mostrado ação vasodilatadora do extrato de *P. albidus* em anéis de artérias aortas (REIS et al., 2022). O percentual de relaxamento promovido no trabalho de Reis et al. (2022) foi superior ao encontrado no presente estudo, diferença que pode estar atrelada, dentre outras influências, à estrutura dos vasos, aos mecanismos vasorreguladores e/ou à diferença nas cepas de cogumelos utilizados. Ainda, esses autores mostraram que a influência vasodilatadora do extrato de *P. albidus* em artérias aortas foi abolida quando essas foram previamente incubadas com L-NAME, inibidor inespecífico da NOS, sugerindo grande influência desse mecanismo na resposta observada.

Já foi sugerido na literatura que a função do endotélio merece destaque na regulação do tônus vascular pela síntese e secreção de NO. Por outro lado, sua depleção induz prejuízo ao relaxamento, reforçando sua destacada ação no controle do tônus vascular (PERES et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2015). No presente estudo, observamos que o *P. albidus* induziu uma menor resposta vasodilatadora nos animais tratados com monocrotalina, sugerindo um prejuízo no relaxamento induzido pelo cogumelo na HAP. Não avaliamos artérias sem a presença do endotélio para comparação no presente trabalho, mas mostramos que, diferentemente do grupo CTRL, o grupo MCT parece depender menos do NO para regulação do tônus do vaso, uma vez que a incubação prévia com inibidor da NOS não teve influência sobre a resposta vasodilatadora do *P. albidus*. PERES et al. (2012) demonstraram que a remoção do endotélio da artéria pulmonar aboliu a capacidade vasodilatadora do vaso, enquanto a remoção do endotélio da artéria mesentérica promoveu grande prejuízo, mas não capaz de abolir a sua capacidade de relaxamento. Portanto, a artéria pulmonar parece ser mais dependente de metabolismo do NO para o relaxamento quando comparada com outros vasos.

De fato, a redução da capacidade vasodilatadora dependente do endotélio tem sido destacada como uma característica na HAP, principalmente por uma menor expressão de eNOS e produção deficiente de NO (SIQUEIRA et al., 2015). Nossos achados corroboram com os de Maciel et al. (2015) e Zimmer et al. (2021), que observaram redução do relaxamento dependente do endotélio em ratos tratados com monocrotalina. Esses achados reforçam o papel da monocrotalina em promover prejuízo no metabolismo do NO. Adicionalmente, a resposta contrátil torna-se aumentada, caracterizando um desequilíbrio na regulação do tônus vascular promovido pela monocrotalina (MACIEL et al., 2015).

A passagem da monocrotalina pelo fígado forma inúmeros metabólitos tóxicos como, por exemplo, a dehidromonocrotalina (WILSON et al., 1992). Esse é transportado, dentre outras formas, pelos glóbulos vermelhos do fígado aos pulmões, onde promove inflamação vascular, maior formação de radicais livres, diminuição da biodisponibilidade do NO, aumento da permeabilidade vascular e aumento da liberação de agentes vasoconstritores, promovendo um desequilíbrio entre vasoconstritores e vasodilatadores (PAN et al., 1991; GOMEZ-ARROYO et al., 2012).

O envolvimento das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, bem como do estresse oxidativo/nitrosativo, na patogênese e na fisiopatologia da HAP têm sido bastante estudados. Trabalhos prévios demonstraram que o desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes ao longo do tempo após administração de monocrotalina pode ser fator determinante para piora funcional na HAP (FÖRSTERMANN et al., 2017; SEOLIN et al., 2015, TURCK et al 2009, ZIMMER et al., 2020). No presente trabalho, ao induzirmos o estresse oxidativo *in vitro* no grupo CTRL, observamos uma redução significativa nos níveis de sulfidrilas, sugerindo que essas se tornaram necessárias para estabilizar as espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, evitar o aumento pronunciado na lipoperoxidação. Por outro lado, os animais que receberam monocrotalina não apresentaram variação nos níveis de lipoperoxidação e sulfidrilas quando o estresse oxidativo foi induzido. Esses achados sugerem que, 21 dias após administração de monocrotalina, os animais já se encontravam em desequilíbrio redox e, portanto, não têm aumento adicional nos parâmetros supracitados. Ainda, a caracterização do estresse oxidativo/nitrosativo já foi bem documentada 21 dias após administração de monocrotalina em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (TÜRCK et al. 2019; ZIMMER et al. 2020). De fato, Zimmer et al. (2020), que relataram aumento da lipoperoxidação e dos níveis de ROS totais no tecido pulmonar 21 dias após administração de monocrotalina, oscilação que parece ser determinante no direcionamento de vias de sinalização redox-sensíveis no tecido cardíaco e pulmonar. Ademais, Silva et al. (2011) observaram um aumento da lipoperoxidação associado com o aumento da resistência vascular pulmonar, hipertrofia e disfunção cardiovascular 21 dias após administração de monocrotalina. Por outro lado, ao avaliarem o estado redox mediante a razão da glutatona reduzida pela glutatona oxidada, apesar do pronunciado prejuízo da função ventricular direita induzido pela monocrotalina, Siqueira et al. 2015 não observaram variações significativas no estado redox celular de homogeneizado cardíaco em ratas 21 dias após administração da droga. Apesar das variações na lipoperoxidação e nas sulfidrilas, não foram observadas diferenças nos níveis de ROS totais entre os grupos ou após indução do estresse oxidativo.

Tais discrepâncias merecem atenção e precisam ser analisadas separadamente. Para entendimento mais completo, uma alternativa complementar para o presente estudo seria avaliar a atividade e o imunoconteúdo das enzimas antioxidantes no tecido pulmonar.

Uma vez mostrada à associação do estresse oxidativo/nitrosativo na HAP, acreditamos que a modulação positiva dos antioxidantes endógenos e/ou a administração de antioxidantes exógenos pode ser promissora na prevenção e/ou no tratamento dessa doença. Para isso, a testagem de compostos bioativos com potencial antioxidante merece atenção. Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem se proposto a investigar esses efeitos com a utilização de diversos compostos. Turck et al., 2019, mostraram que o tratamento com extrato de mirtilo promoveu redução da lipoperoxidação. Já Conzatti et al. (2016), observaram que o sulforafano, um isotiocinato com propriedades antioxidantes encontrado em vegetais crucíferos, foi benéfico em atenuar a piora funcional e o estresse oxidativo no ventrículo direito de ratos que receberam monocrotalina, apesar de não ter atenuado a lipoperoxidação. Ainda, associado à redução do estresse oxidativo, o pré-tratamento com suco de uva preta foi capaz de prevenir o aumento da resistência vascular pulmonar induzida pela monocrotalina (MOSELE et al., 2009).

Além desses, outro composto que tem merecido destaque por sua ação antioxidante é o extrato de cogumelo da espécie *P.albidus*. De fato, doses crescentes desse cogumelo promoveram redução da lipoperoxidação e a oxidação de proteínas em diferentes tecidos (REIS et al., 2022; GAMBATO et al., 2018). Reis et al. (2022) comprovaram a ação antioxidante desse cogumelo que, em parte, está relacionada com a presença de compostos fenólicos, especialmente a ergotioneína, em sua composição. Essa molécula é capaz de prolongar a vasodilatação dependente do NO por atenuar a redução da biodisponibilidade desse gás (GOKCE et al., 2014). Ainda, Reis et al. (2022) demonstraram que o extrato de *P.albidus* foi capaz de atenuar o dano oxidativo em modelo de geração de radicais livres no tecido cardíaco por aumentar a atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutathione peroxidase e consequente redução da lipoperoxidação. Adicionalmente, eles observaram que a dose que teve maior efeito vasorrelaxante foi capaz de prevenir o aumento da lipoperoxidação e a diminuição da enzima óxido nítrico sintase em homogeneizado de artérias aortas, efeitos associados com a redução da atividade da enzima NADPH oxidase nesse tecido (Reis et al. 2022). Embora no presente estudo não tenhamos avaliado a influência de um tratamento por longo prazo com extrato de *P. albidus* sobre parâmetros de estresse oxidativo/nitrosativo nas artérias pulmonares, a maior lipoperoxidação e a menor resposta

vasodilatadora ao extrato de *P. albidus* no grupo MCT indicam participação, pelo menos em parte, da ação antioxidante do mesmo.

Esses resultados vão ao encontro dos achados de Gambato et al. (2018), que verificaram menor produção de espécies reativas de oxigênio em células endoteliais expostas à condição hiperglicêmica, quando incubadas com *P. albidus*. Ainda, a incubação das células com o extrato preservou a atividade das enzimas antioxidantes e os níveis de óxido nítrico e, assim, foi capaz de mitigar o dano oxidativo aos lipídeos e proteínas (GAMBATO et al., 2018).

Contudo, no presente estudo, não observamos influência da incubação com *P. albidus* nos parâmetros de estresse oxidativo avaliados no homogeneizado de tecido pulmonar. Dentre outras influências, o tipo de tecido avaliado, o tempo de exposição e as concentrações de extrato utilizadas podem ser determinantes. Neste sentido, salientamos que o cultivo e composição do extrato, em fase de análise, são fatores primordiais para esse entendimento. Portanto, trabalhos futuros que confirmem nossos achados e complementem nossas análises são fundamentais para aprofundarmos os conhecimentos mecanísticos da cardioproteção promovida pelo cogumelo *Pleurotus albidus*.

6 CONCLUSÃO

Amparados pelos achados inéditos apresentados em nosso estudo, concluímos que o extrato do cogumelo *Pleurotus albidus*, assim como na artéria aorta, também exerce ação vasodilatadora na artéria pulmonar de ratos Wistar. Ao inibirmos de forma inespecífica a ação das óxido nítrico sintases, confirmamos que a administração de monocrotalina torna os animais menos dependentes ao metabolismo do NO para regulação do tônus vascular da artéria pulmonar após 21 dias. Somado a isso, a menor resposta vasodilatadora observada no grupo CTRL após incubação com L-NAME indica que o extrato de *P. albidus* tem ação relacionada com o metabolismo do NO, conhecido classicamente por sua ação vasodilatadora dependente do endotélio. participa na ação do *P. albidus* sobre esses vasos. Em nosso trabalho não observamos redução de marcadores de estresse oxidativo no tecido pulmonar. Porém foi evidente que o tratamento com monocrotalina eleva níveis de lipoperoxidação lipídica no tecido pulmonar, mas não observamos alteração nos níveis de ROS.

7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Com relação às limitações do nosso estudo, entendemos que o cateterismo cardíaco seria importante para verificação direta da pressão ventricular direita e indireta da pressão média da artéria pulmonar. Análises histológicas que confirmassem o remodelamento obstrutivo do parênquima pulmonar e o aumento da área de secção transversal dos cardiomiócitos do ventrículo direito permitiriam confirmação do grau de severidade da doença. Outras medidas como ecocardiografia poderiam nos dar dados pertinentes relacionados a função do VD.

Junto a isso, a avaliação das enzimas antioxidantes e de sistemas antioxidantes como da tioredoxina e/ou da glutatona nos permitiria uma análise mais completa sobre o estado redox.

Por fim, a análise apenas com machos não representa por completo a população acometida pela HAP. Portanto, avaliarmos tais parâmetros também em fêmeas é de suma importância.

REFERÊNCIAS

- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**, 302, n. 2-3, p. 141-145, Apr 20 2001.
- ALP, N. J.; CHANNON, K. M. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 24, n. 3, p. 413-420, Mar 2004.
- BASU, A.; RHONE, M.; LYONS, T. J. Berries: emerging impact on cardiovascular health. **Nutr Rev**, 68, n. 3, p. 168-177, Mar 2010.
- BESHAY, S.; SAHAY, S.; HUMBERT, M. Evaluation and management of pulmonary arterial hypertension. **Respir Med**, 171, p. 106099, Sep 2020.
- BOURGEOIS, A.; OMURA, J.; HABBOUT, K.; BONNET, S. *et al.* Pulmonary arterial hypertension: New pathophysiological insights and emerging therapeutic targets. **Int J Biochem Cell Biol**, 104, p. 9-13, Nov 2018.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, 52, p. 302-310, 1978.
- BÜLBRING, E.; TOMITA, T. Catecholamine action on smooth muscle. **Pharmacol Rev**, 39, n. 1, p. 49-96, Mar 1987.
- CANNON, R. O. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. **Clin Chem**, 44, n. 8 Pt 2, p. 1809-1819, Aug 1998.
- CHEN, H. A.; HSU, T. C.; YANG, S. C.; WENG, C. T. *et al.* Incidence and survival impact of pulmonary arterial hypertension among patients with systemic lupus erythematosus: a nationwide cohort study. **Arthritis Res Ther**, 21, n. 1, p. 82, Mar 27 2019.
- COLOMBO, R. Efeitos do exercício físico aeróbio na modulação de proteínas envolvidas com o remodelamento cardíaco em modelo de cor pulmonale. 2011. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia) - Instituto de Ciências Básicas em saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2011.
- COLOMBO, R. Efeitos do exercício físico aeróbico sobre o remodelamento pulmonar e cardíaco no modelo experimental de cor pulmonale induzido por monocrotalina. 2015. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Fisiologia) - Instituto de Ciências Básicas em saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2015.
- CONDON, D. F.; NICKEL, N. P.; ANDERSON, R.; MIRZA, S. *et al.* The 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension: what's old is new. **F1000Res**, 8, 2019.

CONZATTI, A. Efeitos do sulforafano sobre o remodelamento do ventrículo direito e estado redox em modelo de hipertensão arterial pulmonar. 2016. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia) - Instituto de Ciências Básicas em saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2016

CROSSWHITE, P.; SUN, Z. Nitric oxide, oxidative stress and inflammation in pulmonary arterial hypertension. **J Hypertens**, 28, n. 2, p. 201-212, Feb 2010.

DA ROSA, L. O.; WASUM, R. A.; DILLON, A. J. **Macrofungos (Filo Basidiomycota) do Sul do Brasil: Levantamento e Verificação da Capacidade de Secreção de Enzimas Ligninolíticas**. Novas Edições Acadêmicas, 2016.

DE LIMA-SEOLIN, B. G.; HENNEMANN, M. M.; FERNANDES, R. O.; COLOMBO, R. *et al.* Bucindolol attenuates the vascular remodeling of pulmonary arteries by modulating the expression of the endothelin-1 A receptor in rats with pulmonary arterial hypertension. **Biomed Pharmacother**, 99, p. 704-714, Mar 2018.

DELBIN, M. A. Reatividade vascular de artérias mesentérica de pulmonar de ratos após isquemia/reperfusão pulmonar: efeito do treinamento físico. 2009. 85 f. Tese (Doutorado em Ciência da Motricidade) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro 2009.

DIGNAM, J. P.; SCOTT, T. E.; KEMP-HARPER, B. K.; HOBBS, A. J. Animal models of pulmonary hypertension: Getting to the heart of the problem. **Br J Pharmacol**, 179, n. 5, p. 811-837, Mar 2022.

DOS REIS, E. E.; ARAUJO, M. D.; CARRARO, C. C.; ORTIZ, V. D. *et al.* *Pleurotus albidus* (Agaricomycetes) Antioxidant Action Induces Vasodilation in Aorta Arteries: The Influence of the NADPH/NOS Balance. **Int J Med Mushrooms**, 24, n. 4, p. 31-42, 2022.

DOS SANTOS LACERDA, D.; TÜRCK, P.; GAZZI DE LIMA-SEOLIN, B.; COLOMBO, R. *et al.* Pterostilbene reduces oxidative stress, prevents hypertrophy and preserves systolic function of right ventricle in cor pulmonale model. **Br J Pharmacol**, 174, n. 19, p. 3302-3314, Oct 2017.

EL HAJJ, M. C.; VIRAY, M. C.; TEDFORD, R. J. Right Heart Failure: A Hemodynamic Review. **Cardiol Clin**, 38, n. 2, p. 161-173, May 2020.

FARAHMAND, F.; HILL, M. F.; SINGAL, P. K. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. **Mol Cell Biochem**, 260, n. 1-2, p. 21-29, May 2004.

- FAZAL, S.; BISSERIER, M.; HADRI, L. Molecular and Genetic Profiling for Precision Medicines in Pulmonary Arterial Hypertension. **Cells**, 10, n. 3, Mar 13 2021.
- FERREIRA, A. C.; SEREJO, J. S.; DURANS, R.; PEREIRA COSTA, J. M. *et al.* Dose-related Effects of Resveratrol in Different Models of Pulmonary Arterial Hypertension: A Systematic Review. **Curr Cardiol Rev**, 16, n. 3, p. 231-240, 2020.
- FUJI, S.; MATSUSHITA, S.; HYODO, K.; OSAKA, M. *et al.* Association between endothelial function and micro-vascular remodeling measured by synchrotron radiation pulmonary micro-angiography in pulmonary arterial hypertension. **Gen Thorac Cardiovasc Surg**, 64, n. 10, p. 597-603, Oct 2016.
- FÖRSTERMANN, U.; XIA, N.; LI, H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Circ Res**, 120, n. 4, p. 713-735, Feb 17 2017.
- GAMBATO, G.; PAVÃO, E. M.; CHILANTI, G.; FONTANA, R. C. *et al.* Modulates Mitochondrial Metabolism Disrupted by Hyperglycaemia in EA.hy926 Endothelial Cells. **Biomed Res Int**, 2018, p. 2859787, 2018.
- GAMBATO, G.; TODESCATO, K.; PAVÃO, E. M.; SCORTEGAGNA, A. *et al.* Evaluation of productivity and antioxidant profile of solid-state cultivated macrofungi *Pleurotus albidus* and *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresour Technol**, 207, p. 46-51, May 2016.
- GANITKEVICH V, Y.; ISENBERG, G. Depolarization-mediated intracellular calcium transients in isolated smooth muscle cells of guinea-pig urinary bladder. **J Physiol**, 435, p. 187-205, Apr 1991.
- GIAID, A.; YANAGISAWA, M.; LANGLEBEN, D.; MICHEL, R. P. *et al.* Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. **N Engl J Med**, 328, n. 24, p. 1732-1739, Jun 17 1993.
- GOKCE, G.; ARUN, M. Z. Ergothioneine produces relaxation in isolated rat aorta by inactivating superoxide anion. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 18, n. 21, p. 3339-3345, 2014.
- GOMEZ-ARROYO, J. G.; FARKAS, L.; ALHUSSAINI, A. A.; FARKAS, D. *et al.* The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 302, n. 4, p. L363-369, Feb 15 2012.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, 186, p. 1-85, 1990.
- HESSEL, M. H.; STEENDIJK, P.; DEN ADEL, B.; SCHUTTE, C. I. *et al.* Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 291, n. 5, p. H2424-2430, Nov 2006.

- HOEPER, M. M.; HUMBERT, M.; SOUZA, R.; IDREES, M. *et al.* A global view of pulmonary hypertension. **Lancet Respir Med**, 4, n. 4, p. 306-322, Apr 2016.
- HUMBERT, M.; GUIGNABERT, C.; BONNET, S.; DORFMÜLLER, P. *et al.* Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives. **Eur Respir J**, 53, n. 1, Jan 2019
- HUMBERT, M.; KOVACS, G.; HOEPER, M. M.; BADAGLIACCA, R. *et al.* [2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension]. **G Ital Cardiol (Rome)**, 24, n. 4, p. 1e-116e, Apr 2023.
- HUYNH, N. N.; CHIN-DUSTING, J. Amino acids, arginase and nitric oxide in vascular health. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 33, n. 1-2, p. 1-8, 2006.
- KHANNA, D.; ZHAO, C.; SAGGAR, R.; MATHAI, S. C. *et al.* Long-Term Outcomes in Patients With Connective Tissue Disease-Associated Pulmonary Arterial Hypertension in the Modern Treatment Era: Meta-Analyses of Randomized, Controlled Trials and Observational Registries. **Arthritis Rheumatol**, 73, n. 5, p. 837-847, May 2021.
- KIRSCH, L. E. S.; DE MACEDO, A. J.; TEIXEIRA, M. F. Production of mycelial biomass by the Amazonian edible mushroom *Pleurotus albidus*. **Braz J Microbiol**, 47, n. 3, p. 658-664, 2016.
- LACERDA, D. D. S. Potencial farmacológico do pterostilbeno sobre diferentes alvos no remodelamento ventricular cardíaco: efeitos sobre o ventrículo direito e esquerdo. 2018. 143f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Fisiologia) - Instituto de Ciências Básicas em Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2018.
- LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem Res Toxicol**, 5, n. 2, p. 227-231, 1992.
- LEBER, L.; BEAUDET, A.; MULLER, A. Epidemiology of pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: identification of the most accurate estimates from a systematic literature review. **Pulm Circ**, 11, n. 1, p. 2045894020977300, 2021.
- LI, H.; FÖRSTERMANN, U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. **Curr Opin Pharmacol**, 13, n. 2, p. 161-167, Apr 2013.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193, n. 1, p. 265-275, Nov 1951.

- LUDKE, A. R.; MOSELE, F.; CARON-LIENERT, R.; RIBEIRO, M. F. *et al.* Modulation of monocrotaline-induced cor pulmonale by grape juice. **J Cardiovasc Pharmacol**, 55, n. 1, p. 89-95, Jan 2010.
- MACIEL, P. M. P. Efeito da fração aquosa de cissampelos sympodialis eichl. em artéria pulmonar de rato com hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina. 2015.
- MARIA PELLEGRINO, R.; IANNI, F.; BLASI, F.; ANGELINI, P. *et al.* Lipidomic profiling of Pleurotus ostreatus by LC/MS Q-TOF analysis. **Food Res Int**, 156, p. 111335, Jun 2022.
- MEYRICK, B.; GAMBLE, W.; REID, L. Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. **Am J Physiol**, 239, n. 5, p. H692-702, Nov 1980.
- MOORE, D.; CHIU, S. W. Fungal products as food. **Bio-exploitation of filamentous fungi. Fungal Diversity Press, Hong Kong**, p. 223-251, 2001.
- MOSELE, F. Efeitos do suco de uva preta na modulação redox sensível do remodelamento ventricular direito em modelo de hipertensão arterial pulmonar. 2009. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia) - Instituto de Ciências Básicas em Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2009
- PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev**, 87, n. 1, p. 315-424, Jan 2007.
- PAN, L. C.; LAMÉ, M. W.; MORIN, D.; WILSON, D. W. *et al.* Red blood cells augment transport of reactive metabolites of monocrotaline from liver to lung in isolated and tandem liver and lung preparations. **Toxicol Appl Pharmacol**, 110, n. 2, p. 336-346, Sep 01 1991.
- PARIKH, V.; BHARDWAJ, A.; NAIR, A. Pharmacotherapy for pulmonary arterial hypertension. **J Thorac Dis**, 11, n. Suppl 14, p. S1767-S1781, Sep 2019.
- PERES, E. C. **Estudo da reatividade vascular em ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal: mecanismos envolvidos e papel protetor da sinvastatina.** 2012. 79 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Fisiologia humana) - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo. São Paulo 2012.
- PEÇANHA, G. A. W. **Efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio (HgCl₂) sobre a reatividade vascular e propriedades mecânicas e estruturais de artérias de resistência de ratos.** 2008a. - Tese de Doutorado. Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2008

- PITRE, T.; SU, J.; CUI, S.; SCANLAN, R. *et al.* Medications for the treatment of pulmonary arterial hypertension: a systematic review and network meta-analysis. **Eur Respir Rev**, 31, n. 165, Sep 30 2022.
- PRINS, K. W.; THENAPPAN, T. World Health Organization Group I Pulmonary Hypertension: Epidemiology and Pathophysiology. **Cardiol Clin**, 34, n. 3, p. 363-374, Aug 2016.
- PRISCO, S. Z.; EKLUND, M.; MOUTSOGLOU, D. M.; PRISCO, A. R. *et al.* Intermittent Fasting Enhances Right Ventricular Function in Preclinical Pulmonary Arterial Hypertension. **J Am Heart Assoc**, 10, n. 22, p. e022722, Nov 16 2021.
- RABBO, M. P. D. S. Efeitos do treinamento físico no perfil hemodinâmico e no estresse oxidativo em modelo experimental de Cor pulmonale. 2005. 59 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Fisiologia) - Instituto de Ciências Básicas em Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2005.
- REIS, E. E. D. Influência da incubação in vitro com extrato de *Pleurotus albidus* no estresse oxidativo cardiovascular e na reatividade vascular. 2019. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia) - Instituto de Ciências Básicas em Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2019.
- REIS, M. R. Participação dos canais para potássio nos efeitos cardiovasculares induzidos por um novo composto 1, 3, 4-oxadiazol. 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado em produtos naturais e sintéticos bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 2012.
- ROCHA, V. Influência da leptina na reatividade vascular de anéis de aorta de ratos obesos. 2015. 73 f. Dissertação (Mestrado em Educação Física) - Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória 2015.
- RUITER, G.; DE MAN, F. S.; SCHALIJ, I.; SAIRRAS, S. *et al.* Reversibility of the monocrotaline pulmonary hypertension rat model. **Eur Respir J**, 42, n. 2, p. 553-556, Aug 2013.
- SAMAREH FEKRI, M.; TORABI, M.; AZIZI SHOUL, S.; MIRZAEI, M. Prevalence and predictors associated with severe pulmonary hypertension in COPD. **Am J Emerg Med**, 36, n. 2, p. 277-280, Feb 2018.
- SANDE, D.; OLIVEIRA, G. P.; MOURA, M. A. F. E.; MARTINS, B. A. *et al.* Edible mushrooms as a ubiquitous source of essential fatty acids. **Food Res Int**, 125, p. 108524, Nov 2019.
- SANDERS, K. A.; HOIDAL, J. R. The NOX on pulmonary hypertension. **Am Heart Assoc**. 101: 224-226 p. 2007.

- SANTOS, M. R. G. D. A. D. Use of methylene blue in the reversal of vasoplegia refractory to the use of catecholamines after aortobifemoral bypass. SILVA, L. G. C. D. *Revista Brasileira de Cirurgia Vascul*. 9 2010.
- SANTOS, M. R. G. D. A. D.; SILVA, L. G. C. D.; EVORA, P. R. B.; PICCINATO, C. E. *et al.* Use of methylene blue in the reversal of vasoplegia refractory to the use of catecholamines after aortobifemoral bypass. **Jornal Vascular Brasileiro**, 9, p. 74-77, 2010.
- SEOLIN, B. G. D. L. Efeitos do beta-bloqueador bucindolol na modulação do remodelamento do ventrículo direito em modelo de hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina. 2015.
- SHI, R.; WEI, Z.; ZHU, D.; FU, N. *et al.* Baicalein attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by inhibiting vascular remodeling in rats. **Pulm Pharmacol Ther**, 48, p. 124-135, Feb 2018.
- SHIMODA, L. A.; LAURIE, S. S. Vascular remodeling in pulmonary hypertension. **J Mol Med (Berl)**, 91, n. 3, p. 297-309, Mar 2013.
- SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 21, n. 7, p. 363-383, Jul 2020.
- SILVA, F. L. Adaptação oxidativa e funcional progressiva do sistema cardiopulmonar secundária à hipertensão arterial pulmonar em ratos. 2011. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Fisiologia) - Instituto de Ciências Básicas em Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2011.
- SIQUEIRA, R. Efeitos da ovariectomia no estresse oxidativo em pulmão e ventrículo direito de ratas com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina. 2015. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Fisiologia) - Instituto de Ciências Básicas em Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2015.
- SZTUKA, K.; JASIŃSKA-STROSCHEIN, M. Animal models of pulmonary arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis of data from 6126 animals. **Pharmacol Res**, 125, n. Pt B, p. 201-214, Nov 2017.
- TUDER, R. M. Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. **Cell Tissue Res**, 367, n. 3, p. 643-649, Mar 2017.
- TURCK, P. Efeitos do extrato de mirtilo em modelo de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina. 2019. 181 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Fisiologia) - Instituto de Ciências Básicas em Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2019.

- TÜRCK, P.; FRAGA, S.; SALVADOR, I.; CAMPOS-CARRARO, C. *et al.* Blueberry extract decreases oxidative stress and improves functional parameters in lungs from rats with pulmonary arterial hypertension. **Nutrition**, 70, p. 110579, Feb 2020.
- VANDERPOOL, R. R.; GORELOVA, A.; MA, Y.; ALHAMAYDEH, M. *et al.* Reversal of Right Ventricular Hypertrophy and Dysfunction by Prostacyclin in a Rat Model of Severe Pulmonary Arterial Hypertension. **Int J Mol Sci**, 23, n. 10, May 12 2022.
- WILSON, D. W.; SEGALL, H. J.; PAN, L. C.; LAMÉ, M. W. *et al.* Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. **Crit Rev Toxicol**, 22, n. 5-6, p. 307-325, 1992.
- WU, Y.; DING, Y.; RAMPRASATH, T.; ZOU, M. H. Oxidative Stress, GTPCH1, and Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling in Hypertension. **Antioxid Redox Signal**, 34, n. 9, p. 750-764, Mar 20 2021.
- XU, D.; HU, Y. H.; GOU, X.; LI, F. Y. *et al.* Oxidative Stress and Antioxidative Therapy in Pulmonary Arterial Hypertension. **Molecules**, 27, n. 12, Jun 09 2022.
- ZAFRIR, B. Exercise training and rehabilitation in pulmonary arterial hypertension: rationale and current data evaluation. **J Cardiopulm Rehabil Prev**, 33, n. 5, p. 263-273, 2013.
- ZELT, J. G. E.; CHAUDHARY, K. R.; CADETE, V. J.; MIELNICZUK, L. M. *et al.* Medical Therapy for Heart Failure Associated With Pulmonary Hypertension. **Circ Res**, 124, n. 11, p. 1551-1567, May 24 2019.
- ZIMMER, A. Efeitos do treinamento físico aeróbico sobre o metabolismo do óxido nítrico e da endotelina-1 e sobre o estresse oxidativo no parênquima pulmonar de ratos com hipertensão arterial pulmonar. 2016. 116f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia) - Instituto de Ciências Básicas em Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2016.
- ZIMMER, A. Análise temporal das alterações cardiovasculares e pulmonares no modelo de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina. 2020. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Fisiologia) - Instituto de Ciências Básicas em Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2020.
- ZIMMER, A.; TEIXEIRA, R. B.; BONETTO, J. H. P.; BAHR, A. C. *et al.* Role of inflammation, oxidative stress, and autonomic nervous system activation during the development of right and left cardiac remodeling in experimental pulmonary arterial hypertension. **Mol Cell Biochem**, 464, n. 1-2, p. 93-109, Jan 2020.
- ZIMMER, A.; TEIXEIRA, R. B.; CONSTANTIN, R. L.; CAMPOS-CARRARO, C. *et al.* The progression of pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline is

characterized by lung nitrosative and oxidative stress, and impaired pulmonary artery reactivity. **Eur J Pharmacol**, 891, p. 173699, Jan 15 2021.