

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

LARA LAGES DA SILVEIRA

N-ACETILCISTEÍNA NA TERAPIA DO *Cor pulmonale*
EM RATOS (*Rattus norvegicus*)

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
AGOSTO - 2014

LARA LAGES DA SILVEIRA

N-ACETILCISTEÍNA NA TERAPIA DO *Cor pulmonale*
EM RATOS (*Rattus norvegicus*)

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciência Animal**, na área de concentração de Sanidade Animal.

Orientador: Prof^o. Dr. Antônio Peixoto Albernaz

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

AGOSTO – 2014

“... Mil cairão ao teu lado, e dez mil à tua direita, mas TÚ não serás atingido...”

(Salmo 91:7)

Dedicado

À Trindade divina e à Virgem Maria,
pelo dom da vida ...

Aos pais Célia Maria Lages da Silveira e Edson da Silveira (*in memorian*) e ao esposo Autacyr Cesar Coutinho de Queiroz, por todo amor, carinho, orações e compreensão dedicados ao longo de nossas vidas. Amo vocês incondicionalmente!

Aos meus amores Billy Joo, Jean Paul, Júnior, Cindy, Mel, Pretinha, Neguinha, Tuco e Duque, pelos incontáveis momentos de felicidade plena; Aos meus anjinhos que hoje habitam “o céu dos animais” todo meu amor e minha saudade eterna: Dara Cristina, Boni Wesley, Sacha, Pitucha, Diana Aparecida, Campeão, Lili, Xuxa, Shanely, Chana, Pitty, Mel e Gatão. E de forma muito especial, a cadela Tita Luiza, *in memorian*, o ser que representou o começo de tudo, sendo além de amiga, fonte inspiradora para que este sonho se tornasse realidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Virgem Maria, por vosso infinito amor, bondade e pelos anos de vida maravilhosos que me proporcionaram, permitindo chegar até aqui;

Aos pais Célia Maria Lages da Silveira e Edson da Silveira (*in memoriam*), por todo amor, carinho, confiança e orações dedicados, sendo fundamentais para que conseguisse persistir e alcançar mais este objetivo. Amo vocês e perdoem a ausência muitas vezes necessária;

Ao grande amor, esposo, companheiro e amigo incondicional Autacyr Cesar Coutinho de Queiroz. Obrigada por acreditar e por vezes fazer dos meus sonhos, os seus. Amo-te pra sempre;

Às irmãs Maria das Graças Lages da Silveira, Adriana Lages da Silveira e Patrícia Lages da Silveira, que mesmo a distância sempre torceram e foram grandes incentivadoras ao longo dos anos;

Às irmãs de coração Ana Carolina Leal, Carla Salavessa, Letícia Cazes, Marcella Braga e Patrícia Pereira pelos incontáveis momentos de alegria, sorrisos e lágrimas, mas acima de tudo pelos momentos de sinceridade o qual compartilhamos. Sem vocês estes quatro anos certamente teriam sido menos felizes;

Aos animais, amigos fiéis e grande paixão da minha vida;

Ao Professor Darcy Ribeiro por transformar o seu sonho na nossa realidade;

A CAPES, pela bolsa de estudo concedida e, a UENF pela oportunidade;

Ao orientador e amigo, Antônio Peixoto Albernaz, por acreditar nos meus *devaneios*, e ter concedido essa experiência maravilhosa que foi o meu doutorado. Eternamente grata;

Aos meus eternos mestres, amigos e “pais”, Professores Cláudio Baptista e Eulógio Carlos que pacientemente nos ensinou a arte de pesquisar, clinicar e diagnosticar. Obrigada por confiar e acreditar em nossa capacidade científica e ainda, pelo entusiasmo e pela amizade dispensada durante todos esses anos;

À equipe integrante da linha de pesquisa: Hipertensão Pulmonar, pelo empenho e entusiasmo dispensado durante os longos e difíceis dias de experimento, mas nem por isso menos harmonioso e gratificante;

Aos queridos Rafael Medina, Rachel Bittencourt, Maria Aparecida, Emanuel Kenedy e Anderson Barros que aceitaram e acreditaram em nosso ideal e brilhantemente colaboraram para que esse projeto se tornasse realidade;

À médica veterinária Maria Angélica Viestel, aos técnicos de enfermagem Marília Cipriano e Evaldo Machado do HVET UENF, e à auxiliar de serviços gerais Luciene Faria pela grande ajuda, pela paciência, pelo incentivo, pela disponibilidade e pelos bons momentos de convívio durante todos esses anos;

Meu sincero agradecimento aos professores Claudio Melo e Marinete Pinheiro, sua orientada Flavia Dias, à técnica do biotério da UENF Joana e aos professores Samuel Valença e Manuella Lanzetti da UFRJ, pela imprescindível ajuda no momento crucial do nosso experimento;

À professora Fernanda Antunes pela ajuda dispensada no momento mais difícil da minha vida. A ela, minha eterna gratidão!

Aos ratos Wistar oriundos do Biotério de Experimentação Animal de Ribeirão Preto que mesmo inconscientemente cederam seus corpos em prol da ciência. A eles todo o meu amor, carinho e respeito;

Aos tios, em especial Aloisio Uchôa, primos, sobrinhos, “agregados” e amigos Vicência, Estella, Tereza Moura, Irmã Nair Damé, Juciara Oliveira, Daniele Rodrigues, Viviane Antunes, Edna Cosmos, Lívia Rizzo, Melissa Catete e Penha Monteiro que mesmo a distância, sempre acreditaram e torceram pelo meu sucesso.

RESUMO

SILVEIRA, Lara Lages da. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Agosto de 2014. N-acetilcisteína na terapia do *Cor pulmonale* em ratos (*Rattus norvegicus*). Professor Orientador: Antônio Peixoto Albernaz.

O *Cor pulmonale* (*Cp*) é definido como uma síndrome, caracterizada por alterações patológicas do ventrículo direito (VD), hipertrofia e dilatação, resultantes de uma disfunção pulmonar. Objetivou-se com este trabalho, avaliar o comportamento clínico, bioquímico e histopatológico de ratos induzidos experimentalmente a *Cp*, com monocrotalina (MCT), e tratados com três diferentes protocolos terapêuticos de N-acetilcisteína (NAC). Foram utilizados 57 ratos Wistar machos, subdivididos em nove grupos: A – controle absoluto, S – sem indução com MCT e C – com indução com MCT; e protocolo terapêutico: placebo, NAC10, NAC100 e NAC300. O *Cp* foi induzido por injeção única de MCT (60mg/kg i.p.). Após vinte e um dias de indução, foi iniciado o protocolo terapêutico com NAC, pelo método de gavagem, durante quatorze dias. No 35º dia os animais foram eutanasiados para coleta de materiais e seguintes análises: bioquímica sérica, tecidual e histopatologia. Os dados foram analisados pelos testes análise de variância (ANOVA) de uma via complementada com o teste de comparação múltipla de médias Bonferoni. A MCT induziu sinais clínicos de *Cp*., sendo a dispneia e redução do apetite os mais frequentes, e as diferentes doses de NAC não modificaram esses resultados. Os animais do grupo C apresentaram perda de peso a partir de vinte e um dias de indução, exceto os pertencentes ao grupo C-NAC300 que permaneceram com ganho de peso. Os animais do grupo C apresentaram valores superiores de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), revelando dano hepatocelular, e as diferentes doses de NAC não reverteram esses valores. Os resultados de creatinina foram elevados para o grupo C-PLAC, revelando prejuízos à função renal. As três doses de NAC administradas, foram capazes de reduzir esses valores. Com relação a creatinofosfoquinase (CK) e CK-fração cardíaca (CK-MB), os animais do grupo C-PLAC e C-NAC10 apresentaram valores elevados, revelando prejuízos aos tecidos muscular e cardíaco. As doses de 300 e 100mg/kg de NAC respectivamente, influenciaram positivamente esses resultados. A MCT aumentou a lipoperoxidação (LPO) nos grupos A e S, e as diferentes doses de NAC não reduziram estes valores.

A MCT aumentou a atividade da superóxido desmutase (SOD) nos grupos C-PLAC e C-NAC10, e as doses de 100 e 300mg/kg de NAC reduziram esses resultados; e a catalase (CAT) aumentou no grupo C-PLAC, com as doses de 10 e 100mg/kg de NAC sendo capazes de reverter esses valores. Estes dados revelaram a presença de desequilíbrio redox. A MCT induziu lesões no tecido hepático, não sendo as diferentes doses de NAC capazes de reduzir o número e a frequência das lesões, e também induziu lesões no tecido cardíaco, sendo mais evidente nas câmaras direitas. A MCT foi capaz de produzir hipertrofia do ventrículo direito em ratos, sendo a dose de 300mg/kg de NAC eficiente em reduzir esse efeito. Conclui-se que o modelo experimental adotado foi eficiente no estabelecimento do *Cp.*, e a NAC sugerida como terapia adjuvante no controle desta síndrome.

Palavras-chave: monocrotalina, hipertensão pulmonar, coração, estresse oxidativo.

ABSTRACT

SILVEIRA, Lara Lages da. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). August, 2014. N-acetylcysteine in therapy of *Cor pulmonale* in rats (*Rattus norvegicus*). Professor advisor: Antônio Peixoto Albernaz.

The *Cor pulmonale* (Cp) is defined as a syndrome, qualified by pathological changes in the right ventricle (RV), hypertrophy and dilatation, resulting from a pulmonary dysfunction. The objective of this work, is to evaluate the clinical, biochemical and histopathological behavior on rats experimentally induced to Cp. by monocrotaline (MCT), and treated on three different therapeutic protocols of N-acetylcysteine (NAC). Were used 57 Wistar male rats, subdivided in nine groups: A – absolute control / S – without induction by MCT / C – with induction by MCT; and therapeutic protocols: placebo, NAC10, NAC100 and NAC300. The Cp was induced by a single injection of MCT (60mg/kg i.p.). After 21 days of induction, were initiated the therapeutic protocols with NAC, using gavage (forced feeding), during 14 days. On the 35th day the animals were euthanized for collection of materials and following analysis: biochemical serum, tissue and histopathology. The data were analyzed by the analysis of variance tests (ANOVA) of one way and in addition with a Bonferoni test for comparison of multiples average results. The MCT induced clinical signs of Cp, being dyspnea and reduction of appetite the most frequent ones, and the different doses of NAC were not able to revert the results. The animals on C group showed loss of weight after 21 days of induction, except those from group C - NAC300 which remained gaining weight. The animals on C group showed some superior value of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), revealing hepatocellular damage, and the different doses of NAC were not able to revert those values. The creatinine results were significantly high for group C-PLAC, revealing damage to the renal function. The 3 doses of NAC administered, were able to reduce these values. With respect to creatinephosphokinase (CK) and CK-cardiac fraction (CK-MB), the animals on C-PLAC group and C-NAC10 group showed high values, revealing damages to the muscular and cardiac tissue. The 300 and 100mg/kg doses of NAC influenced positively these results. The MCT increased lipoperoxidation (LPO) on groups A and S), and the different doses of NAC were not able to revert these values. The MCT increased the activity of superoxide dismutase (SOD) on C-

PLAC group and C-NAC10 group, and the 100 and 300mg/kg doses of NAC reduced these results; and the catalase (CAT) increased on C-PLAC group, with the 10 and 100mg/kg doses of NAC being able to revert these values. These data revealed the presence of imbalance redox. The MCT induced some lesions in liver tissue, and the different doses of NAC were not able to reduce the number and the frequency of injuries, it also induced some lesions on cardiac tissue, being more evident on the right chambers. The MCT were able to produce hypertrophy of right ventricle in rats, being the 300mg/kg doses of NAC efficient on reducing this effect. In conclusion the experimental model adopted was efficient on establishing *Cp*. And NAC indicated as adjuvant therapy for the control of this syndrome.

Keywords: monocrotaline, pulmonary hypertension, heart, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Formação de óxido nítrico (NO) pela sintase de óxido nítrico (NOS). (COSTA et al., 1999). 18
- Figura 2:** Planta *Crotalaria spectabilis*. http://www.missouriplants.com/Yellowalt/Crotalaria_spectabilis_page.html 25.03.14. 20
- Figura 3:** Principais alterações celulares geradas pelo estresse oxidativo. (POSSAMAI, 2005 – adaptado HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). 25
- Figura 4:** Estresse Oxidativo (POSSAMAI, 2005). 25
- Figura 5:** Câmara e caixas de acondicionamento dos ratos. Arquivo pessoal, Biotério, UENF, 2013. 37
- Figura 6:** Caixas plásticas acondicionando os ratos. Arquivo pessoal, Biotério, UENF, 2013. 37
- Figura 7:** Imagem evidenciando a presença de pelos amarelados (seta). Arquivo pessoal, Setor de Morfologia, UENF, 2013. 46
- Figura 8:** Imagem evidenciando presença de líquido nas vias aéreas (edema pulmonar). Arquivo pessoal, Setor de Morfologia, UENF, 2013. 46
- Figura 9:** Níveis séricos de ALT (UI/L) em ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em condições laboratoriais. Valores expressos em média (\pm erro padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5%. 53
- Figura 10:** Níveis séricos de AST (UI/L) em ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em condições laboratoriais. Valores expressos em média (\pm erro padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5%. 55
- Figura 11:** Níveis séricos de CREAT (mg/dL) em ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em condições laboratoriais. Valores expressos em média (\pm erro padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5%. 62
- Figura 12:** Níveis séricos de CK (U/L) em ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em

- condições laboratoriais. Valores expressos em média (\pm erro padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5%. 66
- Figura 13:** Níveis séricos de CK-MB (U/L) em ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em condições laboratoriais. Valores expressos em média (\pm erro padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5%. 69
- Figura 14:** Níveis teciduais de TBARS (nMol/mg ptn) em ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em condições laboratoriais. Valores expressos em média (\pm erro padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5%. 72
- Figura 15:** Níveis teciduais de atividade da SOD (U/mg ptn) em ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em condições laboratoriais. Valores expressos em média (\pm erro padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5%. 76
- Figura 16:** Níveis teciduais de atividade da CAT (U/mg ptn) em ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em condições laboratoriais. Valores expressos em média (\pm erro padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5%. 79
- Prancha 1: Macroscopia em ratos. A.** Quantidade moderada de líquido em cavidade torácica (hidrotórax - seta). **B.** Edema subcutâneo discreto em região inguinal (seta). **C.** Dilatação atrial (seta preta) e ventricular (seta branca) direitas. Arquivo pessoal, Setor Morfologia/UENF, 2013. 80
- Prancha 2: Fotomicrografia de fígado de ratos. A.** Degeneração hidrópica médio-lobular difusa. H/E, obj. 10X. **B.** Detalhe da imagem A mostrando processo degenerativo (seta). H/E, obj. 20X. **C.** Congestão centrolobular (seta) e sinusoidal. H/E, obj. 20X. **D.** Detalhe imagem anterior mostrando lesão sinusoidal (seta amarela) e megacariose (seta preta). H/E, obj. 40X. Arquivo pessoal, Setor Morfologia/UENF, 2013. 84

- Prancha 3: Fotomicrografia de fígado de rato. A.** Fígado com padrão histológico preservado. H/E, obj. 20X. **B.** Ampliação da imagem anterior mostrando hepatócitos e veia centro-lobular regulares. H/E, obj. 40X. **C.** Processo congestivo hemorrágico portal (seta). H/E, obj. 4X. **D.** Ampliação da figura anterior evidenciando processo congestivo hemorrágico (seta). H/E, obj. 10X. Arquivo pessoal, Setor Morfologia, UENF, 2013. 84
- Prancha 4: Fotomicrografia de fígado de ratos. A.** Hiperplasia de ductos biliares (seta). H/E, obj. 10X. **B.** Ampliação da imagem anterior evidenciando ductos biliares hiperplásicos (seta). H/E, obj. 20X. Arquivo pessoal, Setor Morfologia, UENF, 2013. 85
- Prancha 5: Fotomicrografia de fígado de rato. A.** Área de contornos irregulares e contidos, hialina e levemente eosinofílica (necrose de coagulação). H/E, obj. 20X. **B.** Ampliação da imagem anterior evidenciando área de necrose (seta). H/E, obj. 40X. Arquivo pessoal, Setor Morfologia, UENF, 2013. 86
- Prancha 6: Fotomicrografia de coração de rato. A.** Degeneração hialina de miocardiócitos individuais em átrio (seta). H/E, obj. 10X. **B.** Ampliação da imagem anterior onde pode ser visto degeneração hialina de fibra miocárdica (seta amarela), e miocardiócitos demonstrando megacariose (seta preta). H/E, obj. 20X. **C.** Degeneração hialina de miocardiócitos individuais em ventrículo (seta). H/E, obj. 20X.. **D.** Ampliação da imagem anterior onde pode ser observada degeneração hialina de miocardiócitos (seta). H/E, obj. 40X. Arquivo pessoal, Setor Morfologia, UENF, 2013. 90
- Prancha 7: Fotomicrografia de coração (ventrículo) de rato. A.** Tecido muscular estriado cardíaco normal (animal A – Controle). H/E, obj. 10X. **B.** Ampliação da imagem anterior onde pode ser visto miocardiócitos sem alteração histológica. H/E, obj. 20X. **C.** Aumento de celularidade intersticial (asterisco). H/E, obj. 10X. **D.** Ampliação da imagem anterior onde se observa o aumento numérico de fibroblastos

intersticiais (seta). H/E, obj. 20X. Arquivo pessoal, Setor Morfologia, UENF, 2013.

91

Prancha 8: Fotomicrografia de coração (ventrículo) de rato. A.

Infiltrado inflamatório mononuclear de permeio aos miocardiócitos. H/E, obj. 10X. **B.** Ampliação da imagem anterior onde podem ser evidenciadas células inflamatórias mononucleares infiltrando-se por entre os miocardiócitos (setas). H/E, obj. 20X. **C.** Hipertrofia de miocardiócitos (seta). H/E, obj. 20X. **D.** Ampliação da imagem anterior onde fica evidente a hipertrofia dos miocardiócitos (setas). H/E, obj. 40X. Arquivo pessoal, Setor Morfologia, UENF, 2013.

93

Prancha 9: Fotomicrografia de coração (ventrículo) de rato. A.

Infiltrado inflamatório mononuclear e fibrose incipiente (seta amarela) de permeio aos miocardiócitos rompidos (setas pretas). H/E, obj. 20X. **B.** Ampliação da imagem anterior onde podem ser evidenciadas células inflamatórias mononucleares e fibrose incipiente (seta amarela) circundando um miocardiócito rompido (seta preta). H/E, obj. 40X. **C.** Miocardiócitos hipertrofiados e hipercontraídos (seta). H/E, obj. 20X. **D.** Ampliação da imagem anterior onde fica evidente a hipertrofia dos miocardiócitos e hipercontração de fibras individuais (seta). H/E, obj. 40X. Arquivo pessoal, Setor Morfologia, UENF, 2013.

95

Prancha 10: Fotomicrografia de coração (ventrículo) de rato. A.

Miocardiócitos necróticos foram removidos por fagocitose pelos macrófagos e a área está passando por um processo de fibrose (seta). H/E, obj. 20X. **B.** Ampliação da imagem anterior com miocardiócitos íntegros ao lado de processo fibrótico (seta). H/E, obj. 40X. **C.** Observa-se aumento de depósito de tecido conjuntivo no miocárdio (seta). Picro-sírius, material visualizado sob luz polarizada, obj. 10X. **D.** Ampliação da imagem anterior (seta). Picro-sírius, material visualizado sob luz polarizada, obj. 20X. Arquivo pessoal, Setor Morfologia, UENF, 2013.

96

Figura 17: Hipertrofia cardíaca direita em ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC), pela relação PVD/PSVE (g/g), sob condições laboratoriais. Valores expressos em média (\pm erro padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5%.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Causas de hipertensão pulmonar e *Cor pulmonale* (OTA, PEREIRA, 1998). 13
- Tabela 2:** Grupos experimentais de ratos induzidos experimentalmente a *Cor pulmonale* com MCT, e submetidos a diferentes protocolos terapêuticos com NAC. Hospital Veterinário/UENF, 2013. 38
- Tabela 3:** Frequência de sinais clínicos manifestados pelos ratos induzidos a *Cor pulmonale* com MCT e tratados com NAC durante o período experimental. Hospital Veterinário/UENF, 2013. 45
- Tabela 4:** Consumo alimentar (g, média \pm DP) de ratos Wistar induzidos a *Cor pulmonale* com MCT, e tratados com N-acetilcisteína (NAC) no período experimental. Hospital Veterinário/UENF, 2013. 49
- Tabela 5:** Peso corporal (g, média \pm DP) de ratos Wistar induzidos a *Cor pulmonale*, com MCT e tratados com N-acetilcisteína (NAC) no período experimental. Hospital Veterinário/UENF, 2013. 49
- Tabela 6:** Número de óbitos de ratos Wistar induzidos a *Cor pulmonale* com monocrotalina e tratados com N-acetilcisteína (NAC) durante o período experimental. Hospital Veterinário/UENF, 2013. 50
- Tabela 7:** Comparação entre médias (\pm Erro Padrão) pelo teste de Bonferroni na probabilidade de 5% ($P \leq 0,05$) para as variáveis bioquímicas séricas de ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em condições laboratoriais ($n = 5 - 7$; $N = 43$). Setor de Patologia Clínica/UENF, 2013. 56
- Tabela 8:** Comparação entre médias (\pm Erro Padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5% ($P \leq 0,05$) para as variáveis bioquímicas teciduais (ventrículo direito) de ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em condições laboratoriais ($n = 5-7$; $N = 43$). LABCOM/IB/UFRJ, 2013. 71
- Tabela 9:** Lesões histopatológicas hepáticas em ratos Wistar portadores de *Cor pulmonale* induzidos por MCT, sobre efeito de N-acetilcisteína (NAC) no período experimental. Setor de Morfologia/UENF, 2013. 81

- Tabela 10:** Lesões histopatológicas atriais em ratos Wistar portadores de *Cor pulmonale* induzidos por MCT, sobre efeito de N-acetilcisteína (NAC) no período experimental. Setor de Morfologia/UENF, 2013. 88
- Tabela 11:** Lesões histopatológicas ventriculares em ratos Wistar portadores de *Cor pulmonale* induzidos por MCT, sobre efeito de N-acetilcisteína (NAC) no período experimental. Setor de Morfologia/UENF, 2013. 89
- Tabela 12:** Comparação entre médias (\pm Erro Padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5% ($P \leq 0,05$) para as variáveis hipertrofia cardíaca direita (VD) em ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em condições laboratoriais (n= 5-7; N= 43). Setor de Morfologia/UENF, 2013. 97

ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------------------------|--|
| μg | Microgramas |
| μl | Microlitros |
| $^{\circ}\text{C}$ | Graus Celsius |
| ADP | Adenosina difosfato |
| ALT | Alanina aminotransferase |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| ANOVA | Análise de variância |
| AST | Aspartato aminotransferase |
| Ca^{++} | Cálcio |
| CAT | Catalase |
| CI | Células intersticiais |
| CK | Creatinofosfoquinase |
| CK-BB | Creatinofosfoquinase isoenzima cerebral |
| CK-MB | Creatinofosfoquinase isoenzima muscular cardíaca |
| CK-MM | Creatinofosfoquinase isoenzima muscular estriado esquelético |
| <i>Cp</i> | <i>Cor pulmonale</i> |
| CREAT | Creatinina |
| CuZnSOD | Cobre-zinco-SOD |
| $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-$ | Radical fenoxil |
| DH | Degeneração hidrópica |
| DHA | Dihidromonocrotalina |
| DHI | Degeneração hialina |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DPOC | Doença pulmonar obstrutiva crônica |
| Ec-SOD | SOD extracelular |
| eNOS | Óxido nítrico sintase endotelial |
| EO | Estresse oxidativo |
| ERN | Espécie reativa de nitrogênio |
| ERO | Espécie reativa de oxigênio |
| FA | Fosfatase alcalina |

| | |
|-------------------------------|----------------------------------|
| g | Gramma |
| g/mol | Gramma por mol |
| GMPc | Guanosina ciclíca de monofosfato |
| GPX | Glutaciona peroxidade |
| GR | Glutaciona redutase |
| GSH | Glutaciona reduzida |
| GSH-DHP | lhidroterocinidina |
| GSSG | Glutaciona oxidada |
| GST | Glutaciona S-transferase |
| G6DP | Glicose-6-fosfatodesidrogenase |
| HAP | Hipertensão arterial pulmonar |
| HDB | Hiperplasia de ductos biliares |
| HE | Hematoxilina e Eosina |
| HM | Hipertrofia miocárdica |
| HNE | 4-hidroxi-2trans-nanenal |
| HP | Hipertensão pulmonar |
| HVD | Hipertrofia ventricular direita |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| IC | Insuficiência cardíaca |
| ICD | Insuficiência cardíaca direita |
| ICE | Insuficiência cardíaca esquerda |
| IL-8 | Interleucina 8 |
| IM | Infiltrado mononuclear |
| i.p. | Intraperitoneal |
| IRC | Insuficiência renal crônica |
| kg | Quilograma |
| LOO [•] | Peróxido lipídico |
| LOOH | Peróxido lipídico |
| LPO | Lipoperoxidação |
| M | Molaridade |
| MCT | Monocrotalina |
| MDA | Malondialdeído |
| mg | Miligrama |

| | |
|-----------------------------|---|
| mg/dL | Miligrama por decilitro |
| mg.kg ⁻¹ | Miligrama por quilo |
| min. | Minuto |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| mM | Milimolar |
| mm Hg | Milímetro de mercúrio |
| MnSOD | Manganês SOD |
| NAC | N-acetilcisteína |
| NAD ⁺ | Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido |
| NADP | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada reduzida |
| NFκB | Fator nuclear K _b |
| nMol/mg ptn | Nanomol por miligrama de proteína |
| NO | Óxido nítrico |
| NO [•] | Radical óxido nítrico |
| NO ₂ | Dióxido de Nitrogênio |
| NOS | Óxido nítrico sintase |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| ONOO ⁻ | Peroxinitrito |
| O ₂ | Oxigênio |
| O ₂ ⁻ | Ânion superóxido |
| OH ⁻ | Radical hidroxil |
| ¹ O ₂ | Singleto de oxigênio |
| PCI | Peso corporal inicial |
| PCF | Peso corporal final |
| PMI | Índice de performance miocárdica |
| PSVE | Peso do septo interventricular + ventrículo esquerdo |
| ptn | Proteína |
| PVD | Peso do ventrículo direito |
| RL | Radical livre |
| SARA | Síndrome da angústia respiratória aguda |

| | |
|--------------|---|
| SOD | Superóxido dismutase |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TBA | Ácido Tiobarbitúrico |
| TBARS | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| TLG | Telangiectasia |
| TNF α | Fator de necrose tumoral |
| U/mg ptn | Unidade internacional por miligrama de proteína |
| U/L | Unidades internacionais por litro |
| UV | Raios ultravioleta |
| VD | Ventrículo direito |
| VE | Ventrículo esquerdo |
| XO | Xantina oxidase |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 8 |
| | 1.1 HIPÓTESE | 9 |
| | 1.2 JUSTIFICATIVA | 9 |
| | 1.3 OBJETIVOS | 10 |
| | 1.3.1 Objetivos Gerais | 10 |
| | 1.3.2 Objetivos Específicos | 10 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 11 |
| | 2.1 Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP) | 11 |
| | 2.1.1 Cor pulmonale (Cp.) | 13 |
| | 2.1.2 Fisiopatogenia | 14 |
| | 2.1.3 Sintomatologia | 15 |
| | 2.2 Hipertrofia Cardíaca | 15 |
| | 2.3 Papel do Óxido Nítrico na HAP | 16 |
| | 2.4 Modelos Experimentais de Insuficiência Cardíaca | 18 |
| | 2.4.1 Monocrotalina (MCT) como Modelo Experimental de HAP e IC (Cor pulmonale) | 18 |
| | 2.5 Radical Livre | 20 |
| | 2.6 Estresse Oxidativo (EO) | 24 |
| | 2.7 Relação de HAP por MCT e EO | 26 |
| | 2.8 Defesas Antioxidantes | 28 |
| | 2.8.1 Superóxido Dismutase (SOD) | 29 |
| | 2.8.2 Catalase (CAT) | 29 |
| | 2.9 Terapia Antioxidante | 30 |
| | 2.9.1 N-acetilcisteína (NAC) | 31 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| | 3.1 Comitê de Ética para Uso de Animais | 35 |
| | 3.2 Local | 36 |
| | 3.3 Amostragem | 36 |
| | 3.4 Grupos Experimentais e Protocolo Terapêutico..... | 38 |
| | 3.5 Protocolo Experimental | 39 |
| | 3.6 Eutanásia | 39 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 3.7 | Desenho Experimental | 40 |
| 3.8 | Coleta de Material e Processamento: Bioquímica Sérica | 41 |
| 3.9 | Hipertrofia Cardíaca | 41 |
| 3.10 | Coleta de Material e Processamento: Anatomopatologia | 41 |
| 3.11 | Preparação do Tecido Cardíaco: Análises Bioquímicas | 42 |
| 3.12 | Quantificação de Proteínas | 42 |
| 3.13 | Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) | 43 |
| 3.14 | Atividade da Catalase (CAT) | 43 |
| 3.15 | Atividade Superóxido Dismutase (SOD) | 43 |
| 3.16 | Delineamento Estatístico | 44 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 44 |
| 4.1 | Avaliação Clínica | 44 |
| 4.1.1 | Sinais Clínicos | 44 |
| 4.1.2 | Consumo Alimentar e Peso Corporal | 47 |
| 4.1.3 | Mortalidade | 50 |
| 4.2 | Análises Bioquímicas | 50 |
| 4.2.1 | Marcadores Hepáticos | 50 |
| 4.2.1.1 | <i>Alanina Aminotransferase (ALT)</i> | <i>51</i> |
| 4.2.1.2 | <i>Aspartato Aminotransferase (AST)</i> | <i>53</i> |
| 4.2.1.3 | <i>Fosfatase Alcalina (FA)</i> | <i>56</i> |
| 4.2.1.4 | <i>Albumina</i> | <i>57</i> |
| 4.2.2 | Marcadores Renais | 59 |
| 4.2.2.1 | <i>Ureia</i> | <i>59</i> |
| 4.2.2.2 | <i>Creatinina</i> | <i>60</i> |
| 4.2.3 | Marcadores de Tecido Muscular (Esquelético e Cardíaco) | 62 |
| 4.2.3.1 | <i>Creatinofosfoquinase (CK)</i> | <i>62</i> |
| 4.2.3.2 | <i>Creatinofosfoquinase Isoenzima Muscular Cardíaca (CK-MB).....</i> | <i>66</i> |
| 4.2.4 | Lipoperoxidação (LPO) | 70 |
| 4.2.5 | Enzimas Antioxidantes | 72 |
| 4.2.5.1 | <i>Superóxido Dismutase (SOD).....</i> | <i>72</i> |
| 4.2.5.2 | <i>Catalase (CAT)</i> | <i>76</i> |
| 4.3 | Análises Morfológicas e Morfométricas | 79 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.3.1 | Histopatologia Hepática | 80 |
| 4.3.2 | Histopatologia Renal | 86 |
| 4.3.3 | Histopatologia Cardíaca | 87 |
| 4.3.4 | Hipertrofia Cardíaca Direita (HCD) | 96 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 100 |
| 6 | CONCLUSÕES | 102 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 103 |

1. INTRODUÇÃO

A Hipertensão arterial pulmonar (HAP) é definida como o aumento na pressão arterial pulmonar, acima de 25 mmHg (pequenos animais). Sua etiologia é imprecisa, sendo na maioria das vezes um processo secundário a outros distúrbios. A HAP caracteriza-se pela presença de remodelamento vascular, trombose *in situ* e vasoconstrição pulmonar. Por este motivo, a utilização de substâncias que tenham ação sobre a circulação pulmonar, talvez seja a base para o tratamento da doença.

Cor pulmonale (Cp) manifesta-se por alterações patológicas do ventrículo direito (VD) resultantes de uma disfunção pulmonar. Essas manifestações quando crônicas apresentam-se como hipertrofia e dilatação do VD secundária à HAP decorrente de doença vascular e/ou do parênquima pulmonar, culminando com um quadro de insuficiência cardíaca direita (ICD). A insuficiência cardíaca (IC) ocorre pela incapacidade funcional do coração em adaptar-se às exigências nutricionais e de oxigenação demandadas pelos tecidos. Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da IC ainda não foram completamente entendidos, porém vários estudos mostram a participação de espécies reativas de oxigênio (ERO) nestes processos.

Com o objetivo de minimizar ou inibir os efeitos deletérios dos oxidantes, o organismo possui um complexo e eficiente sistema de defesa antioxidante, que é composto de elementos enzimáticos e não enzimáticos.

Algumas substâncias possuem o potencial de neutralizar as ações dos radicais livres, prevenindo os danos oxidativos. Os antioxidantes são responsáveis por manter em equilíbrio as concentrações de oxidantes, evitando um excesso na sua formação ou combatendo-as uma vez que tenham sido formadas.

Dentre os inúmeros antioxidantes estudados estão a n-acetilcisteína, ácido ascórbico, resveratrol, ômega 3, α -tocoferol, alopurinol, diferoxamina, catalase, glutathione peroxidase (GPX), superóxido dismutase, magnolol, tempol entre outros.

A NAC é um antioxidante amplamente estudado, sendo bem conhecida como precursora da glutathione, e utilizada clinicamente como droga mucolítica e no tratamento da intoxicação por paracetamol, com raros efeitos adversos.

Modelos experimentais de HAP têm sido criados e caracterizados para estudar e entender seus mecanismos, objetivando prevenção e tratamento das

manifestações clínicas. Entre os modelos experimentais de HAP amplamente utilizados está a administração da monocrotalina (MCT), uma toxina classificada como um alcaloide macrocíclico pirrolizidina. Uma única aplicação de MCT intraperitoneal em ratos produz, na segunda ou terceira semana subsequente, características clínicas que se assemelham à HAP idiopática em humanos.

Muito já se sabe a respeito de diagnósticos e agentes causadores desta doença, entretanto os reais fatores e processos desencadeantes das doenças cardiovasculares, em especial a síndrome da IC, ainda permanecem obscuros.

1.1 HIPÓTESE

Baseado em dados extraídos da literatura que afirmam a relação positiva entre hipertensão pulmonar e estresse oxidativo (EO), o presente estudo tem a intenção de testar a hipótese de que os animais submetidos à situação de EO, quando induzidos com MCT a um quadro de *Cor pulmonale* e, submetidos à terapia antioxidante com NAC (10mg/kg, 100mg/kg, e 300mg/kg) apresentam melhora clínica, laboratorial e/ou estrutural do ventrículo direito.

1.2 JUSTIFICATIVA

A HAP induzida por MCT está relacionada com o aumento na formação de ERO e a redução na síntese de óxido nítrico (NO) nos tecidos pulmonares e cardíacos. Por modular esses fatores, a administração de uma terapia antioxidante poderá contribuir para o controle e a redução dos efeitos deletérios dos oxidantes sobre esses tecidos e atenuação da doença de base.

A NAC é uma substância antioxidante comprovadamente eficiente, de fácil administração, com raros efeitos colaterais e com boa atuação em tecidos pulmonares e cardíacos, através de suas propriedades imunomoduladoras, antioxidantes e anti-inflamatórias.

A NAC além de fornecer cisteína para a biossíntese de glutathiona (GSH), um importante tripeptídeo que atua nos processos de desintoxicação e manutenção do equilíbrio redox, também atua como *scavenger* de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), um importante mensageiro para a síntese e ativação de mediadores inflamatórios.

Embora o ácido ascórbico, α -tocoferol e a vitamina K tenham sido amplamente utilizados para neutralizar diretamente agentes oxidantes, eles não podem, no entanto, repor a cisteína necessária para a síntese e reposição da GSH. Sugerindo desta forma, que a NAC seja uma droga promissora como terapia adjuvante de doenças associadas ao EO.

Desta forma, esse trabalho justifica-se por contribuir em estudos futuros, tanto na medicina humana quanto veterinária, relacionados ao efeito antioxidante da NAC sobre o tecido cardíaco, foco da doença, sendo a proposta terapêutica neste modelo experimental.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivos Gerais

Testar em ratos Wistar, o efeito antioxidante da NAC em três doses distintas (10mg/kg, 100mg/kg, e 300mg/kg) no quadro de *Cor pulmonale* induzido experimentalmente com MCT; tentando identificar a dose mais eficiente.

1.3.2 Objetivos Específicos

Induzir experimentalmente *Cor pulmonale* em ratos (*Rattus norvegicus*) através da administração de MCT;

Avaliar os parâmetros clínicos indicativos de *Cor pulmonale*;

Avaliar consumo alimentar e evolução do peso corporal dos animais;

Mensurar parâmetros bioquímicos séricos: alanina aminotransferase (ALT); aspartato aminotransferase (AST); fosfatase alcalina (FA); albumina, ureia, creatinina, creatinofosfoquinase (CK) e CK-MB isoenzima massa (CK-MB);

Mensurar marcadores de estado redox em homogeneizados de VD: CAT e SOD;

Mensurar marcadores de dano oxidativo/lipoperoxidação em homogeneizado VD: TBARS;

Quantificar o grau de hipertrofia cardíaca;

Avaliar os tecidos hepático, renal e cardíaco do ponto de vista histopatológico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP)

A Hipertensão Arterial Pulmonar é uma condição progressiva por uma obstrução pré-acinar das artérias pulmonares e aumento da resistência vascular pulmonar, com consequente elevação da pressão arterial pulmonar média (RUBIN, 1993). Ela pode ocorrer como um fenômeno isolado ou associado a inúmeras alterações cardiopulmonares, estando relacionada a elevados níveis de morbidade e mortalidade (RABBO, 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2020, mais de 40% do total de óbitos da população humana mundial estará relacionado a doenças cardiovasculares. No Brasil, segundo dados do Sistema Único de Saúde (SUS), a insuficiência cardíaca acomete dois milhões de pessoas, com uma incidência de duzentos e quarenta mil novos casos por ano. Apesar da relevância dada a esta patologia em humanos, a HAP ainda é pouco descrita na medicina veterinária, sendo responsável por um elevado índice de morbidade e mortalidade.

Sua etiologia é incerta, visto os múltiplos genes e fatores ambientais envolvidos. Entretanto, os achados histológicos evidenciam proliferação de células endoteliais e musculares lisas das artérias e, consequente remodelamento vascular pulmonar (RUBIN, 2004).

Simonneau et al. (2009) classificam esta síndrome, de acordo com a etiologia, em cinco grupos : a) idiopática; b) causada por envolvimento do coração esquerdo; c) decorrente de hipoxemia; d) relacionada à obstrução da artéria pulmonar e e) miscelânea que agrupa causas como sarcoidose, adenopatia, tumor e fibrose mediastinal. Belerenian (2007) descreve que na medicina veterinária, a HAP pode ser classificada em primária; secundária: a tromboembolia pulmonar, doenças cardíacas e doenças respiratórias; ou idiopática.

A HAP é um achado frequente sendo consequência de inúmeras doenças (Tabela 1) (RICH, 1998). A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma das principais doenças envolvidas na ocorrência da HAP (RABBO, 2005).

A DPOC é um importante fator de risco para o desenvolvimento de outras doenças crônicas, onde se inclui as doenças cardiovasculares. Na literatura, já está

bem estabelecido que doenças pulmonares possam causar diretamente alterações na mecânica cardíaca, culminando em prejuízos que invariavelmente induzem o estabelecimento da IC (SIETSEMA, 2001).

Diversos estudos sugerem que a vasoconstrição pulmonar é um dos mecanismos envolvidos na patogênese da hipertensão pulmonar (HP), com hipertrofia da camada média, redução da produção de vasodilatadores pelo endotélio pulmonar (prostraciclina e óxido nítrico) e, aumento da produção de vasoconstritores (endotelina). Logo, a utilização de substâncias com ação sobre a circulação pulmonar, torna-se a base para o tratamento da doença (ARCHER, RICH, 2000). Modelos experimentais de HAP têm revelado que a prevenção ou a reversão do aumento da pressão nas artérias pulmonares está associada com a restauração da atividade da óxido nítrico sintase endotelial (NOS) (CAMPBELL et al., 2001).

Nos últimos anos, o reconhecimento precoce e a expansão de novas opções de tratamento têm melhorado o prognóstico para pacientes com HAP (BOGAARD et al., 2009; YILDIZ, 2009).

Tabela 1 – Causas de hipertensão pulmonar e *Cor pulmonale* (OTA, PEREIRA, 1998).

| CAUSAS DE HPE E <i>Cor pulmonale</i> | |
|---|---|
| 1. | <p><i>Doenças alveolares e de vias aéreas</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - DPOC - Fibrose cística - Doenças infiltrativas e granulomatosas <ul style="list-style-type: none"> • Sarcoidose • Fibrose pulmonar idiopática • Colagenólise • Radiação • Pneumoconiose - Obstrução de vias aéreas superiores - Pneumopatia secundária - Pneumopatia congênita (fístula arteriovenosa) |
| 2. | <p><i>Doenças da caixa torácica</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Cifoescoliose - Doença neuromuscular - Síndrome da apneia do sono - Hipoventilação idiopática - Fibrose pleural |
| 3. | <p><i>Doenças vasculares do pulmão</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Hipertensão pulmonar primária - Arterite pulmonar granulomatosa (Sarcoidose e Esquistossomose) - Induzida por drogas <ul style="list-style-type: none"> • Anorexígenos • Cocaína • Triptofano - Anemia falciforme - Tromboembolismo pulmonar - Vasculites - Doença pulmonar venoclusiva |
| 4. | <p><i>Compressão vascular pulmonar extrínseca</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Tumores mediastinais - Aneurismas - Granulomatose - Fibrose mediastinal |

2.1.1 *Cor pulmonale* (Cp)

O termo *Cor pulmonale* é definido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma síndrome, caracterizada por alterações patológicas do ventrículo direito (VD), resultantes de uma disfunção pulmonar (LÜDKE, 2007). Tais alterações quando crônicas apresentam-se sob a forma de hipertrofia e dilatação do VD secundária à HAP, decorrente de uma doença do parênquima pulmonar e/ou

sistema vascular (BRAUNWALD, 1997, RABBO, 2005). Esta definição, não se torna verdadeira, quando as alterações pulmonares são secundárias às doenças que afetam o lado esquerdo do coração ou a cardiopatias congênitas (LÜDKE, 2007).

As modificações estruturais e funcionais apresentadas pelos pulmões levam a um aumento na tensão que o VD precisa desenvolver para contrair-se. Logo, o incremento da pós-carga imposto ao VD, torna-se o principal estímulo para a ocorrência da hipertrofia miocárdica (SIETSEMA, 2001).

O VD não é capaz de sustentar a sobrecarga de pressão em longo prazo, ocorrendo diminuição da força de contração, por mudanças estruturais e funcionais dos cardiomiócitos, e conseqüente dilatação do VD. Os mecanismos de transição da hipertrofia à dilatação no VD não estão bem definidos, mas sugere-se que modificações neuro-hormonais, ativação do sistema imune, estresse oxidativo e nitrosativo, entre outros, modifiquem o desenvolvimento da ICD na HAP (BOGAARD et al., 2009).

Os portadores de *Cp*. apresentam alterações em sua fisiologia cardiorrespiratória, que são responsáveis pela limitada capacidade em executar atividades. Tal fato dá-se, pela ineficiência na oferta de oxigênio, em situações de aumento na demanda energética para o exercício, gerando um déficit no consumo de oxigênio. Esta situação é determinante para o estabelecimento da fadiga precoce, comumente observada nestes indivíduos, gerando uma incapacidade em executar suas atividades diárias, com conseqüente redução na qualidade de vida (RABBO, 2005).

2.1.2 Fisiopatogenia

A HAP resulta em mudanças compensatórias no lado direito do coração, ou seja, um remodelamento cardiovascular para suportar o aumento da carga de trabalho imposta à musculatura cardíaca, progredindo para uma hipertrofia compensatória do ventrículo direito e insuficiência cardíaca associada à elevada taxa de mortalidade, conhecida como *Cp*. (MERELES et al., 2006). Comumente a HAP é o elo entre as mudanças funcionais e estruturais do ventrículo direito, e a doença pulmonar (FARAHMAND et al., 2004; CHAOUAT et al., 2008). A presença de HAP com *Cp* geralmente está associada a um pior prognóstico, independente da doença de base. A sobrevida estimada, na presença de *Cp*, é de 45% em dois anos, contra

69% na sua ausência (MACNEE, 1992). Antes do surgimento e uso rotineiro das novas drogas disponíveis para o tratamento da doença, a sobrevivência média dos pacientes com HAP era de 2,8 anos após o diagnóstico (RICH et al., 2000).

Modelos experimentais de HAP e *Cp.* têm sido criados e caracterizados para estudar e entender seus mecanismos. As pesquisas desenvolvidas têm o intuito de prevenir e tratar manifestações clínicas que culminam com IC, pois esta doença ainda é responsável por elevado índice de morbidade e mortalidade dentro da população humana mundial (PAN et al., 1993).

2.1.3 Sintomatologia

Segundo Ricachinevsky e Amantéa (2006), seres humanos com HAP, independente da etiologia, não apresentam um quadro clínico específico. As crianças apresentam sintomas predominantes de baixo débito cardíaco, como falha no crescimento, letargia, irritabilidade, taquipneia e taquicardia. Em contrapartida, os adultos referem algum grau de desconforto respiratório, fadiga, cefaleia, dor torácica, sendo esta provavelmente decorrente de isquemia ventricular direita, e episódios de síncope pós-esforço. Eventualmente casos de morte súbita podem ocorrer. Os pacientes veterinários podem apresentar fadiga, intolerância ao exercício, angústia respiratória, tosse, estertores e crepitações pulmonares, além de expiração prolongada (KELLUM; STEPIEN, 2007). Segundo Hegewald et al. (2007), dispneia, ortopneia, fraqueza, dor torácica e hemoptises podem estar presentes. Zabka et al. (2006) descreveram que os sinais clínicos se apresentam de forma progressiva e caracterizam-se por dispneia ou taquipneia, letargia e intolerância ao exercício, normalmente associados a estresse ou excitação.

2.2 Hipertrofia Cardíaca

Para manter sua eficiência, a atividade cardíaca necessita de um complexo sistema de interação, que envolve componentes do sistema neuroendócrino, sinalizadores celulares para transcrição gênica e componentes funcionais do músculo cardíaco. Desta forma, a estrutura miocárdica desempenha papel primordial no trabalho eficiente deste órgão (RABBO, 2005).

Uma característica intrínseca de todas as células é a sua capacidade de modificar seu funcionamento em resposta a estímulos externos. Assim, alterações extracelulares identificadas pelos cardiomiócitos, são capazes de promover modificações tanto bioquímicas e eletrofisiológicas, quanto estruturais do mesmo. Dependendo do tipo, do grau e da duração destes estímulos, as modificações adaptativas apresentadas pela célula cardíaca podem alterar suas características funcionais (RABBO, 2005).

Durante seu desenvolvimento, o cardiomiócito sofre inúmeras modificações e, na fase adulta, é passível de ser alterado em decorrência de determinadas doenças. A hipertrofia miocárdica é provavelmente o melhor exemplo de adaptação de uma estrutura celular à estimulação (TERRACIO, THOMAS, 1998).

A hipertrofia cardíaca classifica-se em fisiológica (induzida pelo exercício) ou patológica (resposta a sobrecarga crônica de volume e/ou pressão) (WAKATSUKI et al., 2004). Na manifestação patológica, a reestruturação do tecido cardíaco tem a finalidade de compensar uma redução na função contrátil do coração. Tal processo é transitório e evolui para estágios mais avançados, onde o miocárdio hipertrofiado torna-se progressivamente incapaz de manter um débito cardíaco adequado. Em longo prazo, ocorre uma redução do tecido contrátil e substituição de tecido funcional por tecido fibroso, com conseqüente redução da capacidade contrátil miocárdica, e a instalação de um quadro de IC (BELERENIAN et al., 2007).

O aumento gradual da pressão diastólica final e a redução da pressão sistólica ventricular final indiciam o desenvolvimento e a instalação do processo de IC (BELERENIAN et al., 2007). Com o objetivo de tentar compensar tais modificações hemodinâmicas, alguns mecanismos são disparados, sendo o controle da resposta ao remodelamento cardíaco, o mais amplamente conhecido (TOMBE, 1998).

2.3 Papel do Óxido Nítrico na HAP

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa que possui um elétron desemparelhado, é lipofílico e se difunde prontamente através das membranas plasmáticas de acordo com o gradiente de concentração. Em decorrência de sua estrutura química, o elétron desemparelhado confere reatividade com outras moléculas, desencadeando muitos e diferentes efeitos biológicos. Um exemplo bem

conhecido dessas reações envolve a difusão de NO de células vasculares endoteliais para células da musculatura lisa vascular, onde o NO reage com o ferro de grupamentos heme da guanilato ciclase solúvel, alterando sua conformação e ativando a enzima. Uma vez ativada, a guanilato ciclase produz guanosina monofosfato cíclica (GMPc), promovendo o relaxamento dessas células na musculatura lisa vascular (LÜDKE, 2007).

Segundo Coggins e Bloch (2007), esses efeitos bioquímicos é que promovem respostas vasodilatadoras do NO, desencadeando mecanismos de sinalização para estímulo e modulação do tônus vascular e do fluxo sanguíneo.

Além disto, o NO participa ainda de inúmeras outras reações biologicamente importantes. No estado gasoso, ele reage com o oxigênio (O_2) para formar o dióxido de nitrogênio (NO_2), um gás tóxico que se forma proporcionalmente às concentrações de NO e oxigênio. Em solução, ele reage com O_2 para formar metabólitos inativos – nitrato e nitrito. O NO também pode reagir rapidamente com o oxigênio em radical superóxido para formar peroxinitrito (ONOO), um potente oxidante, que pode levar a danos teciduais em síndromes agudas pulmonares (HART, 1999).

As óxido nítrico sintases (NOS), são enzimas responsáveis pela produção de NO, a partir do aminoácido arginina gerando como produto, a citrulina. Três diferentes isoformas já foram identificadas: NOS endotelial – eNOS, isolada do endotélio; NOS induzível – iNOS, por sua expressão se tornar elevada mediante a necessidade de uma resposta inflamatória; e NOS neuronal – nNOS, por sua predominante expressão no tecido neuronal (COGGINS; BLOCH, 2007).

Evidências indicam que a expressão das isoformas nNOS e eNOS (constitutivas) e a síntese intravascular de NO, participam da regulação da reatividade vascular pulmonar em órgãos saudáveis. Indicam ainda, que o NO desempenha importante papel na regulação de eventos vasculares, nas vias aéreas e nos processos inflamatórios. A produção deficiente deste gás na vasculatura pulmonar está fortemente associada com a ocorrência de HAP (HART, 1999).

Expressões reduzidas de NOS no endotélio vascular pulmonar de pacientes portadores de HAP primária e secundária, sugerem que a atenuação sustentada da produção de NO, tem relação com alterações significativas de tônus vascular (GIAD; SALEH, 1995). Logo, alterações na produção de NO a partir da eNOS, parece desempenhar um importante papel na patogênese da HAP (LÜDKE, 2007).

Modelos experimentais de HAP têm mostrado que a prevenção ou reversão do aumento da pressão nas artérias pulmonares está associada com a restauração da atividade da NOS (CAMPBELL et al., 2001).

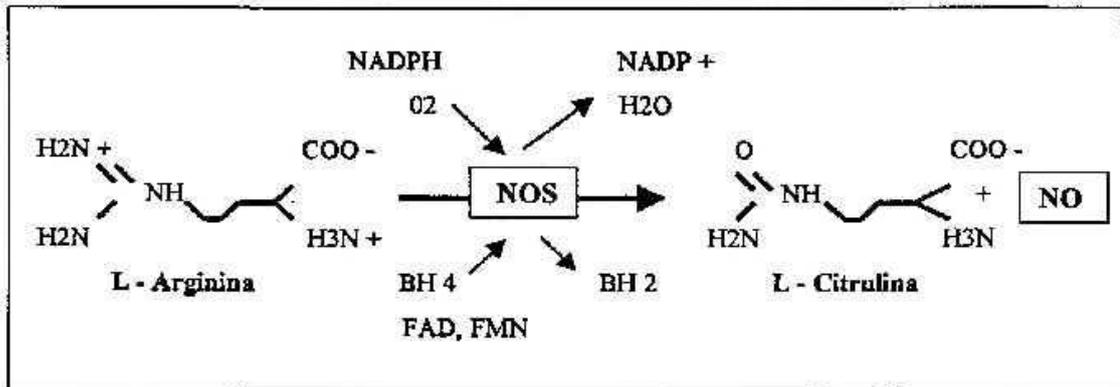


Figura 1 – Formação do óxido nítrico (NO) pela óxido nítrico sintase (NOS) (COSTA et al.; 1999).

2.4 Modelos Experimentais de Insuficiência Cardíaca

2.4.1 Monocrotalina (MCT) como Modelo Experimental de HAP e IC (*Cor pulmonale*)

A MCT é derivada de uma planta amplamente distribuída por vários continentes, onde mais de 200 tipos já foram identificados, em 300 diferentes espécies de plantas de mais de 13 famílias. As plantas não tóxicas são comumente utilizadas como fonte alimentar, e também na medicina. E por este motivo, muitas vezes as que apresentam propriedades tóxicas, acabam se desenvolvendo como ervas daninhas nas plantações, sendo colhidas juntamente com os grãos. Em decorrência disto, vários eventos de contaminação humana já foram documentados (WILSON et al., 1992).

A MCT é uma substância química classificada como alcaloide macrocíclico pirrolizidina, presente em uma variedade de plantas, como nas sementes de *Crotalaria spectabilis* (Figura 2). Sua toxicidade depende de sua estrutura química, onde somente os que possuem ligação dupla na posição 1,2 são tóxicos (COMINI, 1996). No fígado, a MCT é bioativada a um alcaloide pirrol, a dihidromonocrotalina (DHA), que é um metabólito reativo. Ele é transportado até os pulmões, onde causa

mudanças megalocíticas nas células endoteliais pulmonares, gerando ativação prolongada e lesão no leito vascular com consequente remodelamento estrutural dos mesmos, hipertensão arterial pulmonar, hipertrofia do ventrículo direito por aumento da pós-carga e posterior insuficiência cardíaca (CHENG et al., 2005).

A toxicidade seletiva pelo pulmão é contrária a de outros alcaloides pirróis por diferenças no metabolismo hepático e cinética sanguínea da MCT. A MCT se acumula nos eritrócitos, onde é estabilizada durante o transporte até o pulmão. Uma segunda fase deste metabolismo acontece com a conjugação da MCT e a glutathiona (GSH), que representa a reação de detoxificação (CHENG et al., 2005).

A MCT tem sido utilizada para reproduzir um modelo de HAP, de hipertrofia e ICD, pois quando na circulação, causa proliferação celular nas arteríolas pulmonares, impedância ao fluxo sanguíneo com consequente HAP (SILVA, 2011). Este quadro progride à hipertrofia compensatória do VD e ao progressivo desenvolvimento de IC. Trabalhos envolvendo este modelo experimental têm apresentado alterações diferenciais tempo-dependentes. Farahmand et al. (2004) observaram aumento na pressão ventricular direita a partir do sétimo dia após injeção com MCT, sendo que aos quatorze dias encontraram aumento do peso do VD. Estudo feito por Daicho et al. (2009) acompanhou animais injetados com MCT por oito semanas, onde se verificou aumento do peso pulmonar, redução do peso corporal e hipertrofia cardíaca a partir de quatorze dias, com sinais de ICD a partir da sexta semana. A variabilidade de estudos feitos com os efeitos da MCT deve-se não somente às deficientes janelas temporais, mas também às concentrações da droga, caracterizando-se como uma droga de efeitos tempo e dose-dependentes.

Uma das principais vantagens da utilização deste modelo, é que uma única injeção intraperitoneal de MCT em ratos é capaz de mimetizar nas duas ou três semanas subsequentes, várias alterações patológicas apresentadas por pessoas portadoras de HAP e *Cor pulmonale*, sem precisar de intervenções cirúrgicas (WOLKART et al., 2000; JASMIN et al., 2003). Após quatro horas, uma injeção de MCT na dose de 60mg/kg promove alterações celulares como edema da camada média nas arteríolas pulmonares e migração de células inflamatórias depois de oito a dezesseis horas, progredindo para remodelamento vascular até o oitavo dia (SEGALL, 1989). Após sete dias, surgem os primeiros indícios de aumento da resistência vascular pulmonar pelo retardo no tempo de ejeção de sangue pela artéria pulmonar, iniciando mais íntima relação com a adaptação cardíaca, que irá

culminar com IC por volta da terceira semana (JONES et al., 2002), e o aumento progressivo do VD.

Em ratos, a MCT causa necrose hepática periacinar somente em altas doses, enquanto que uma dose única baixa causa hipertensão arterial pulmonar e *Cor pulmonale*, sem a ocorrência de doença hepática associada (RABBO, 2005).

Nem todas as espécies são susceptíveis a MCT. Em suínos e aves a MCT causa doença renal (WILSON et al., 1992).

Deste modo, a MCT na dose única de 60mg/kg, torna-se um modelo apropriado para estudar com detalhes a patofisiologia da HAP, *Cor pulmonale* e IC, objetivando identificar novas estratégias terapêuticas em humanos (SEYFARTH et al., 2000; RABBO, 2005).



Figura 2. Planta *Crotalaria spectabilis* (http://www.missouriplants.com/Yellowalt/Crotalaria_spectabilis_page.html 25.03.14)

2.5 Radical Livre

Radical livre é qualquer espécie química (átomo ou molécula) que possua um ou mais elétrons desemparelhados em qualquer orbital, normalmente o mais externo, capaz de existência independente (CAVALCANTE, BRUIN, 2009).

Com a descoberta do oxigênio como componente químico do ar por Priestley (1774), foi descrito quase que simultaneamente a sua toxicidade. Lavoisier, já em 1783, provou que altas pressões de oxigênio tinham efeito tóxico sobre os pulmões de animais. No entanto, foi Paul Bert (1871) que estabeleceu as bases da toxicidade do oxigênio hiperbárico. Bert concluiu que todas as formas de matéria viva sofriam efeitos tóxicos sob essas circunstâncias experimentais. Os estudos de toxicidade do oxigênio dependem do organismo em estudo, de sua idade, estado fisiológico e dieta (HALLIWELL, 1992).

O oxigênio apesar de seus inúmeros benefícios, também é considerado um composto tóxico, especialmente para o pulmão, que é o órgão com maior superfície de contato com o ar ambiente. A molécula de oxigênio é essencialmente não reativa, mas durante o metabolismo aeróbio as células produzem radicais livres de oxigênio (ROCHA 2008).

Com exceção de certos anaeróbios e organismos unicelulares aeróbios tolerantes, todos os animais, plantas e bactérias necessitam de oxigênio para produção de energia através do uso de canais transportadores de elétrons, dependente de oxigênio, tais como aqueles nas mitocôndrias das células de eucariontes. Os aeróbios sobrevivem porque eles possuem defesas antioxidantes para sua proteção, envolvendo um complicado equilíbrio entre a geração de substâncias extremamente reativas, os radicais livres e a habilidade desses organismos em controlar tais substâncias (TORRES, 2005). Os organismos que toleram a presença de oxigênio utilizam mecanismos metabólicos como oxidases, oxigenases, hidroxilases, tais como tiroxina hidroxilase ou citocromo P-450 (POSSAMAI, 2005).

A função principal do sistema imunológico é a defesa do organismo contra agentes infecciosos. Células fagocíticas tais como macrófagos e neutrófilos são essenciais para respostas antimicrobianas, pois essas células liberam quantidades acrescidas de moléculas altamente tóxicas, tais como espécie reativa de nitrogênio (ERN) e ERO. Existem evidências que não somente células inflamatórias, mas também células não inflamatórias como, epitélio das vias aéreas, liberam estas moléculas reativas (FOLKERTS et al., 2001).

Os oxidantes são importantes em diversos processos fisiológicos, mas também podem ter efeitos prejudiciais em células das vias aéreas e tecidos quando produzidos em altas quantidades, ou durante a ausência de vários antioxidantes.

Esses mediadores possuem um papel proeminente na patogênese de muitas desordens inflamatórias nas vias aéreas (SILVA, 2008).

Os oxidantes têm sido identificados como mediadores de diversas fases de dano celular e ativação de células imunes durante a resposta inflamatória. Os macrófagos são as principais células responsáveis pelo mecanismo de fagocitose das partículas ultrafinas que atingem o sistema respiratório, estimulando a liberação de mediadores inflamatórios como fator de necrose tumoral (TNF α) (WOOD et al., 2003). A inabilidade dos macrófagos em fagocitar uma grande quantidade de partículas, resulta em uma estimulação contínua das células epiteliais, com aumento da produção de citocinas como IL-8, que contribuem para o processo inflamatório (WOOD et al., 2003).

Situações de imunidade comprometida e distúrbios de reparação conduzem a processos de danos intracelulares, gerando oxidação em compartimentos macro e micromoleculares, aumentando a ocorrência de arteriosclerose, mutação e carcinogênese, degradação do colágeno, decréscimo na atividade enzimática, menor concentração de adenosina trifosfato (ATP) e maior agregação plaquetária (STEPNIEWSKA et al. 2014).

Quase todas as doenças pulmonares estão relacionadas com processos inflamatórios, onde a maioria é gerada por níveis tóxicos de ERO e ERN. A produção destas espécies reativas inicia usualmente pela formação de ânion superóxido (O_2^-), onde sofre reação catalisada pela enzima superóxido desmutase (SOD), resultando na desmutação em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e este, por reações mediadas pelo ferro (reação de Fenton) se converte em radical hidroxil (OH^-) (SILVA, 2008).

Os oxidantes com efeito citotóxico incluem o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxil (OH^-), o singlete de oxigênio (1O_2), o peróxido lipídico (LOOH), o peroxil lipídico (LOO^-), o radical fenoxil ($C_6H_5O^-$), o óxido nítrico (NO) e, o radical óxido nítrico (NO^-) (ZOBAN & CERNY, 2003).

Dentre todas as formas de geração de estresse oxidativo, a produção de H_2O_2 parece ter um papel central tanto na produção celular, através do metabolismo oxidativo, quanto na ação citotóxica de diversos agentes exógenos. Entretanto, por ser o H_2O_2 um oxidante relativamente estável, acredita-se que seus efeitos biológicos sejam mediados pelo radical OH^- . A grande produção de superóxido facilita também sua reação com óxido nítrico NO^- e conseqüente geração de peroxinitrito ($ONOO^-$), que em conjunto com o radical hidroxil são oxidantes

altamente deletérios (SILVA, 2008). Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação dos oxidantes, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, acarretando alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares.

A LPO é o resultado da oxidação dos lipídios de membrana causado principalmente pelo OH^\cdot . Este processo pode levar a dano na integridade da membrana, causando desarranjos na homeostasia e consequente morte celular (FERREIRA, MATSUBARA, 1997). Desta forma, ocorre uma perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo das organelas, como enzimas hidrolíticas dos lisossomos e, formação de produtos tóxicos. A LPO também pode estar relacionada aos mecanismos de envelhecimento, à neoplasia e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

A peroxidação lipídica resulta em uma mistura complexa de hidroperóxidos e produtos secundários de oxidação, incluindo aldeídos como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-trans-nanenal (HNE) (ANDREAZZA et al., 2004). O MDA é um produto da LPO, sendo utilizado através da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) na análise da LPO *in vitro*, expresso em MDA e equivalentes (nmol/mg proteína) (POSSAMAI, 2005).

Inúmeras doenças estão associadas à ação dos oxidantes com moléculas biológicas, tais como diabetes, catarata, síndrome de Parkinson e doenças cardiorrespiratórias (RABBO, 2005). Os danos no ácido desoxirribonucleico (DNA) causados pelos radicais livres também desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (POULSEN et al., 1998).

Nem sempre os processos de LPO são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). Todavia, o excesso desses produtos pode ser lesivo (ROSS, MOLDEUS, 1991).

Em proteínas, os oxidantes podem gerar dano aos receptores, às enzimas, à transdução de sinais, ao transporte de proteínas e de enzimas, além de danos em outras moléculas. A oxidação de proteínas pode ativar o sistema imunológico, induzindo a formação de anticorpos e doenças autoimunes (GALLOWAY, HANDY, 2003). Os danos gerados às enzimas reparadoras de DNA, podem elevar os níveis

de dano oxidativo no DNA, aumentando a frequência de mutações (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

A detecção de grupo carbonil está sendo utilizada como indicador de dano oxidativo proteico (URSO, CLARKSON, 2003). O aumento de proteínas carboniladas está associado a vários distúrbios patológicos incluindo artrite reumatoide, doença de Alzheimer, síndrome do distúrbio respiratório, doença de Parkinson e arteriosclerose (ZWART et al., 1999).

Jong et al. (2000) e Farahmand et al. (2004), utilizando o modelo experimental de *Cor pulmonale*, descreveram a evidente participação dos oxidantes nos diferentes estágios de desenvolvimento, tanto de hipertrofia quanto de IC.

2.6 Estresse Oxidativo (EO)

Atualmente, o grande desafio no estudo das doenças cardiorrespiratórias está em identificar os papéis dos inúmeros mediadores e mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatogenia da doença (SILVA, 2008).

Em organismos aeróbios saudáveis, a produção de ERO e ERN é balanceada com as defesas antioxidantes. Quando há um desequilíbrio que se perpetua, pode ocorrer dano em moléculas que podem ou não ser reparadas (DNA) ou substituídas (oxidação de proteínas) (POSSAMAI, 2005).

EO pode resultar da redução de defesas antioxidantes, ou de um aumento na produção de ERO, pela exposição a concentrações excessivas de oxigênio ou agentes intoxicantes (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). Ele é definido como um acúmulo de ERO, que geram danos à estrutura das biomoléculas de DNA, lipídios, carboidratos e proteínas, além de outros componentes celulares (Figura 3) (SILVA, 2008). Ou ainda, define-se como um distúrbio no balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes (Figura 4), em favor do primeiro, gerando um dano em potencial (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). O alvo principal do EO pode variar dependendo da célula, do tipo de exposição e da severidade do estresse (FRIDOVICH, 1998).

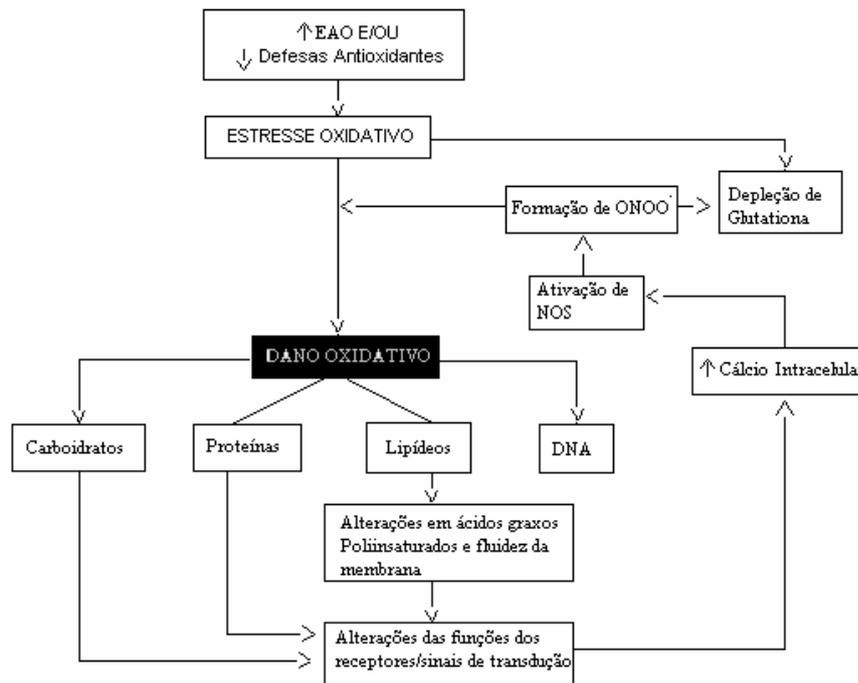


Figura 3. Principais alterações celulares geradas pelo EO (POSSAMAI, 2005 – adaptado HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

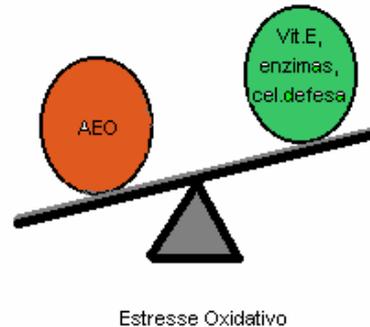


Figura 4. Estresse Oxidativo (POSSAMAI, 2005)

O EO pode resultar em adaptação ou lesão celular. Na adaptação, as células podem tolerar o EO, através da autorregulação da síntese de defesas antioxidantes até restabelecer o equilíbrio. A lesão é o resultado de estímulos químicos ou fisiológicos, que altera de forma transitória ou permanente a homeostase celular. A resposta à lesão pode ser reversível ou irreversível, sendo as reversíveis chamadas de adaptações celulares (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

A morte celular pode ocorrer essencialmente de duas formas: necrose e apoptose. A apoptose também chamada de morte programada, é um tipo de

autodestruição celular que requer energia e síntese proteica para a sua execução. Está relacionada com a homeostase na regulação fisiológica do tamanho dos tecidos, exercendo um papel contrário ao da mitose. A necrose diferencia-se da apoptose por representar um fenômeno degenerativo irreversível, causado por uma agressão intensa. Ela promove uma degradação progressiva das estruturas celulares sempre que existir uma agressão ambiental severa (POSSAMAI, 2005).

O EO desregula o metabolismo do Ca^{++} , aumentando os níveis celulares de cálcio, que, ao se ligar com a calmodulina, é capaz de ativar a óxido nítrico sintetase, e gerar o NO^- . Este pode formar ONOO^- , que é neurotóxico (figura 3). A caumodulina é uma proteína que se liga ao Ca^{++} , amplamente distribuída, cuja ligação a outras proteínas é gerada em decorrência de alterações na concentração intracelular de Ca^{++} . Tal ligação modifica a atividade de várias enzimas-alvo e proteínas de transporte de membrana (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

É sugerido que o EO esteja envolvido no quadro de transição da hipertrofia compensada para a insuficiência cardíaca (SINGAL et al., 1999).

2.7 Relação de HAP por MCT e EO

O desenvolvimento de HAP pela MCT resulta em degeneração e/ou hiperplasia do endotélio pulmonar (DEMARCO et al., 2010). Redução da luz e hipertrofia da túnica média das arteríolas pulmonares podem ser observadas três a sete dias após injeção de MCT (MEYRICK; GAUBLE, REID, 1980), resultando no aumento da resistência vascular pulmonar, aumentando assim a pressão no VD. Observa-se ainda um decréscimo na razão do número de arteríolas pelo número de alvéolos vinte e um dias após a administração de MCT indicando perda vascular (WILSON et al., 1992).

Ludke et al. (2010) demonstraram diminuição na expressão da óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) após vinte e um dias da injeção de MCT. Posteriormente, DeMarco et al. (2010) demonstraram que a disfunção endotelial do modelo de MCT está associada a hipóxia e inflamação do tecido pulmonar. O processo inflamatório age como ativador do sistema xantina oxidase (XO) que aumenta a atividade da NOX_2 , proteína acoplada à NADPH oxidase que também é ativada pela redução da produção de NO decorrente da redução de eNOS. Por sua vez, a NADPH oxidase estando mais ativa aumenta a produção de oxidantes (DEMARCO et al., 2010).

Diversos autores (PICHARDO et al., 1999; FARAHMAND et al., 2004; RABBO et al., 2008) têm relacionado a fisiopatologia da HAP induzida por MCT à produção aumentada de oxidantes e EO. Farahmand et al. (2004) observaram importante hipertrofia e dilatação do VD ao longo de seis semanas de experimento, bem como aumento da atividade de enzimas antioxidantes envolvidas tanto na dismutação do radical superóxido (SOD), como na redução do peróxido de hidrogênio (CAT e GPX) à água quatorze dias após injeção de MCT. Anteriormente, já se havia demonstrado que aos vinte e um dias após MCT na dose de 60mg/kg, não havia alteração na atividade dessas mesmas enzimas. Entretanto, observaram uma depleção na concentração de tocoferol associado a um aumento da LPO (PICHARDO et al., 1999).

Este modelo também é caracterizado pela elevação nos níveis de SOD tanto no tecido pulmonar como no VD (KAMEZAKI et al., 2008; CSISZAR et al., 2009). Estudos têm demonstrado que a terapia antioxidante pode atenuar o desenvolvimento da HAP em modelos com MCT. A inoculação intra-traqueal de adenovírus contendo o gene humano para SOD extracelular pode atenuar o desenvolvimento de HAP (KAMEZAKI et al., 2008). A administração intraperitoneal de EUK-134, um SOD/CAT mimético, também reduziu o EO, a fibrose intersticial e a sinalização pró-apoptótica com melhora da função do VD, sem que se saiba, no entanto, sua ação sobre o VE (REDOUT et al., 2010). Também já foi demonstrado que o antioxidante resveratrol diminui a infiltração de leucócitos na vasculatura pulmonar, na proliferação de células musculares lisas na artéria pulmonar, no EO induzido pela NADPH oxidase, e previne o desenvolvimento de HAP e a hipertrofia do VD (CSISZAR et al., 2009).

No entanto, apesar dos diversos estudos envolvendo o modelo experimental MCT, os mecanismos fundamentais pelo desenvolvimento e pela progressão da IC não estão completamente esclarecidos. Visto que esses achados relacionam fortemente o aumento da produção de ERO, tanto ao remodelamento das arteríolas pulmonares quanto à hipertrofia e insuficiência do VD. O conhecimento da patogenia que envolve tanto a HAP quanto o envolvimento do EO é primordial para que terapias antioxidantes eficientes sejam propostas. Mas, ainda há uma grande lacuna sobre o conhecimento das repercussões neste modelo experimental.

2.8 Defesas Antioxidantes

Durante o curso do metabolismo celular, a molécula de O_2 passa por um processo de redução completa até água. Entretanto, 3 – 5% destas moléculas são convertidas a produtos reduzidos, também chamados oxidantes (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

Existem substâncias que possuem o potencial de neutralizar as ações dos oxidantes, prevenindo os danos oxidativos. A esse grupo denomina antioxidantes (LUDKE, 2007). Antioxidante é qualquer substância que quando presente em baixas concentrações, se comparadas às de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato, enzimático ou não enzimático (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). É considerado o centro do equilíbrio das reações redox no corpo humano, não agindo isoladamente, mas sinergicamente (SILVA, 2008). Os antioxidantes podem agir diretamente na neutralização da ação dos oxidantes, ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos com essa função (BOWLER et al., 2002).

Seus mecanismos de ação são muitos, podendo incluir remoção de O_2 presente no meio, atuar como *scavengers*, “varrendo” os oxidantes ou seus precursores, inibir a formação das ERO, quelar metais que catalisam sua formação, induzir o aumento da geração de antioxidantes endógenos, entre outros mecanismos, envolvendo muitas vezes integração funcional de vários destes componentes (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

Os antioxidantes podem ser divididos em naturais, normalmente presentes no organismo, e compostos sintéticos (PICADA et al., 2003).

Os mecanismos de defesa antioxidante são formados por enzimas, tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona S-transferase (GST), e outras que não participam diretamente do processo, mas fornecem suporte à GPx, como a glicose-6-fosfatodesidrogenase (G6DP), e a glutaciona redutase (GR). Além dessas defesas enzimáticas, existem ainda antioxidantes não enzimáticos, como o α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), flavonóides e outras moléculas como o β -caroteno e N-acetilcisteína (NAC) (RITTER et al., 2004; DEL VECCHIO et al., 2011).

Existem vários estudos que demonstram evidências da atividade protetora dos componentes do sistema antioxidante. As lesões de reperfusão pós-isquemias

do coração, rim, fígado e intestino são prevenidas por SOD e CAT (LEFER; GRANGER, 2000). Algumas citocinas, em particular a TNF α , que é produzida em condições de isquemia cerebral ou inflamação, exercem efeito protetor, em parte ao aumentar a expressão da SOD. (GALLOWAY, HANDY, 2003).

2.8.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD é considerada a mais importante enzima antioxidante. Ela está presente em abundância nas células aeróbias, e pertence à família das metaloenzimas, promovendo a conversão do O $_2^-$ a H $_2$ O $_2$ e oxigênio molecular (AFONSO et al., 2007; RITTER, 2007). O O $_2^-$ é altamente reativo e pode causar danos teciduais devido à proliferação e apoptose de células endoteliais (PANDEY et al., 2000). Um sistema antioxidante efetivo de um indivíduo adulto saudável pode neutralizar até 1.75 kg desses radicais diariamente.

O peróxido de hidrogênio produzido por este grupo de enzimas é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a CAT ou GPX (ANDREAZZA et al., 2004).

Apesar de serem uma importante linha de defesa contra as ERO, uma elevada atividade de SOD encontra-se envolvida com o aumento do EO em inúmeros modelos experimentais (NELSON et al., 2006), provavelmente por produzir H $_2$ O $_2$ além da capacidade de degradação da célula (RITTER, 2007).

Em mamíferos, foram identificadas três isoformas de SOD reconhecidas importantes: Cobre-zinco-SOD (CuZnSOD), que é encontrada no citoplasma; a Manganês-SOD (MnSOD), encontrada exclusivamente na mitocôndria; e a SOD-extracelular (EC-SOD), que é encontrada principalmente em compartimentos extracelulares, como o plasma, a linfa e o líquido sinovial (AFONSO et al., 2007).

2.8.2 Catalase (CAT)

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do H $_2$ O $_2$ a H $_2$ O e O $_2$. Ela é encontrada no sangue, na medula óssea, no rim, no fígado e foi considerada um importante antioxidante do pulmão. Sua atividade é dependente de NADPH (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

A CAT atua complementarmente à GPx, não permitindo a produção de hidroxil a partir do H_2O_2 (RITTER, 2007).

Em células eucarióticas, as catalases estão presentes no citosol e nos peroxissomas, principalmente (ANDREAZZA et al., 2004). O peroxissoma é a principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, fonte inesgotável de peróxidos orgânicos, produtos carbonílicos e oxigênio singlete. A CAT também pode ser encontrada nas mitocôndrias das células do tecido cardíaco (VASCONCELOS et al., 2007). Alguns órgãos não possuem peroxissomas, e por este motivo estão mais expostos aos danos provocados pela produção dos oxidantes, como o coração, os pulmões e o cérebro. Nesses órgãos, um mecanismo de defesa acaba sendo a difusão do H_2O_2 para o sangue, onde reage com a CAT eritrocitária (BLOKHINA et al., 2003; ANDREAZZA et al., 2004).

2.9 Terapia Antioxidante

A terapia exógena assim como dietas ricas em agentes antioxidantes, parece impedir ou pelo menos reduzir o prejuízo funcional causado pelos oxidantes (VAN et al., 1997). Apesar do grande número de estudos positivos sobre terapias antioxidantes, muitos autores afirmam que a utilização destes agentes tem sido ineficaz. Tais resultados podem ser justificados em decorrência de inúmeras causas, dentre elas: utilização da terapia precoce ou tardiamente; aplicação da terapia em pequenos grupos ou ainda grupos de maior risco; utilização de dose inadequada; administração de apenas um antioxidante; testes em grupos não homogêneos onde se deseja obter profilaxia e cura; dentre outras (PRYOR, 2000; DELANTY; DICHTER, 2000; GUERRA, 2001).

Os estudos sobre agentes antioxidantes têm ressaltado, principalmente, o uso de nutrientes isolados no tratamento e na prevenção de doenças. Porém, nos alimentos é encontrada uma variedade de substâncias que podem atuar sinergicamente na proteção celular e tecidual (HENCBERG et al., 1998).

O efeito cooperativo entre dois antioxidantes, como por exemplo, a vitamina C e vitamina E, tem sido frequentemente mencionado na literatura, demonstrando que a interação das mesmas é efetiva na supressão da LPO de membrana e na proteção do DNA (GEY, 1998; BIANCHI, ANTUNES, 1999).

A importância concernente ao desempenho dos antioxidantes *in vivo*, depende dos seguintes fatores: tipos de radicais livres formados; onde e como são gerados; análise e métodos para a identificação de danos e doses ideais para obter proteção. Logo, é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, porém seja ineficiente na proteção, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros sistemas ou tecidos (HALLIWELL et al., 1995).

As principais substâncias utilizadas e testadas como agentes antioxidantes são: as vitaminas A, C e E, clorofilina, flavonoides, carotenoides, curcumina, selênio, zinco e a NAC (BIANCHI, ANTUNES, 1999; DOURADO et al., 2006).

2.9.1 N-acetilcisteína (NAC)

A NAC está entre os mais estudados antioxidantes, sendo testada no tratamento de diversas enfermidades, dentre elas: sepse, DPOC, síndrome da angústia respiratória aguda (SARA), insuficiência renal crônica (IRC) e insuficiência hepática aguda (GUERRA, 2001; DOURADO et al., 2006; CAVALCANTE, BRUIN, 2009). A NAC tem sido utilizada ainda, por promover proteção cardíaca em modelo experimental animal, através de propriedades imunomoduladoras, antioxidantes e anti-inflamatórias, gerando benefícios sobre a vasculatura pulmonar e função cardíaca direita. (FOLTZ, 2012; CHAUMAIS et al., 2014).

Conhecida como precursora artificial da glutathiona (GSH), a NAC é utilizada clinicamente como uma droga mucolítica, e no tratamento da intoxicação por paracetamol, promovendo raros efeitos adversos (RITTER, 2007).

A NAC é considerada uma pró-droga de cisteína (ZAFARULLAH et al., 2003). É uma excelente fonte de grupamento sulfidril, que no organismo é convertido a metabólitos que estimulam a biossíntese de GSH. No interior da célula, a NAC sofre desacetilação liberando cisteína, um aminoácido essencial para a síntese desse importante tripeptídeo (GSH), ajudando nos processos de desintoxicação e na manutenção do equilíbrio redox celular (SIQUEIRA, 2011).

Existem quatro grandes pares de defesa redox interdependente: GSH / GSSG, NADPH / NADP⁺, NADH / NAD⁺ e tioredoxina, que interagem para regular o ambiente redox (SCHAFER, BUETTNER, 2001). A perda da capacidade antioxidante em uma célula que é estressada oxidativamente acontece principalmente devido a uma diminuição nos níveis de GSH e/ou um aumento da

GSSG, porque a GSH é o mais abundante tiol livre intracelular. Assim, o EO in vivo, traduz principalmente deficiência de GSH e/ou do seu precursor, a cisteína (ATKURI et al., 2007).

A NAC também é conhecida como *scavenger* de H_2O_2 , do ácido hipoclorídico e do radical hidroxil, e por este motivo, inibe a liberação de $TNF\alpha$, a ativação de citocinas pró-inflamatórias e apoptose (RITTER, 2007). Alguns estudos sugerem que a expressão do gene $TNF\alpha$ seja controlada pela transcrição da NF- κ B, cuja atividade pode ser induzida pelo H_2O_2 . A NAC mostrou inibir a atividade desta enzima em várias linhagens celulares, inclusive em macrófagos peritoneais de ratos (PAHAN et al., 1998). O H_2O_2 diretamente ou indiretamente através de sua redução a radical hidroxil, via reação de Fenton, atua como mensageiro na síntese e ativação de mediadores inflamatórios. Então, a NAC atuando como *scavenger* destes radicais, acaba inibindo a liberação dos mesmos. Por estas razões, o papel antioxidante da NAC é reconhecido (RITTER, 2007).

Quimicamente a NAC é semelhante à cisteína. Todavia, a presença do radical acetilo em sua estrutura molecular, reduz a reatividade do tiol, quando comparando com a cisteína. Assim, a NAC torna-se menos tóxica, menos suscetível à oxidação, e mais solúvel em água, tornando-se uma melhor fonte de cisteína do que a administração parenteral da própria cisteína (BONANOMI, GAZZANIGA; 1980).

Embora a NAC possa eliminar diretamente radicais livres, as constantes de velocidade para a reação com as ERO são várias ordens de magnitude inferior àquelas geradas pelas enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e GPX. Com isso, a eliminação de radicais livres diretamente pela atividade da NAC não é de grande importância para sua atividade antioxidante in vivo (JONES et al., 2003).

A função primária da NAC in vivo é fornecer cisteína necessária para a síntese e o reabastecimento de GSH. Estudos farmacocinéticos demonstraram que a NAC sofre um extenso metabolismo de primeira passagem no fígado e nos rins, resultando em concentrações muito baixas de NAC "livre" no plasma (HOLDINESS, 1991; COTGREAVE, 1997), e praticamente níveis indetectáveis em outros fluidos corporais, como lavado brônquico (BRIDGEMAN et al., 1991). Na administração oral, a NAC é prontamente absorvida no estômago e intestino (NOSZAL et al., 2000), chegando ao fígado através do sistema porta, onde está quase totalmente convertida em cisteína (COTGREAVE, 1997). O fígado incorpora a maior parte desta cisteína em GSH, e em seguida, a maior parte é segregada na circulação

(GRIFFITH, MEISTER, 1979). A NAC tem sido utilizada principalmente nas intoxicações por paracetamol, fornecendo concentrações adequadas de GSH. Uma excessiva depleção deste agente durante superdosagem de paracetamol pode causar dano hepático permanente (ATKINSON, 2002).

Estudo comparando diferentes formas de administração da NAC demonstrou que a formulação tópica não tem revelado aumento sistêmico nos níveis de NAC, cisteína, ou GSH. Além disso, a apresentação aerossol pode resultar na oxidação de NAC, podendo ter consequências negativas (SARNSTRAND et al., 1999). Já a administração intravenosa eleva transitoriamente a NAC plasmática em níveis muito elevados, sendo conhecida por causar efeitos adversos. Embora situações clínicas por vezes, ditar a necessidade de uma administração intravenosa, na maioria das vezes a administração de NAC ocorre pela via oral (PRESCOTT, 2005).

Estudos relacionados com a administração oral de NAC mostraram que doses elevadas desta droga (8000 mg/dia), não promoveram reações adversas significativas. Entretanto, uma pequena fração dos indivíduos avaliados relatou ter náuseas, vômitos e azia (DE ROSA et al., 2000). Em outro ensaio controlado com NAC e placebo, em uma dose média de 6900 mg/dia, quatorze dos sessenta indivíduos participantes, relataram desconforto gástrico. No entanto, sete desses quatorze indivíduos foram no grupo placebo, sugerindo uma relação com a ingestão do excipiente, que mais tarde foi reconhecido por conter lactose (DE ROSA et al., 2000). Em contraste, alguns casos graves como reações anafiláticas que incluem urticaria, hipotensão e vômitos, foram relatados após a administração intravenosa de NAC. Estas reações desapareceram rapidamente quando a administração de NAC foi interrompida ou a taxa de administração intravenosa de NAC foi diminuída. No geral, os dados disponíveis em estudos com NAC sugerem que quando a cisteína é entregue por via oral, em uma forma não tóxica, a toxicidade associada com alta ingestão de cisteína torna-se insignificante (PRESCOTT, 2005).

A suplementação com antioxidantes tem sido estudada extensivamente como um método para se combater doenças associadas ao EO. Embora comumente a vitamina C, α tocoferol e a vitamina K tenham sido utilizadas para neutralizar diretamente oxidantes, elas não podem, no entanto, repor a cisteína necessária para síntese e reposição de GSH (HALLIWELL, 1996). Desta forma, a NAC tem provado ser mais eficaz no tratamento de doenças associadas a estresse oxidativo (ATKURI et al., 2007).

Na sepse, a ação antioxidante da NAC é reconhecida quando utilizada antes de sua indução. Alguns estudos mostraram que houve um aumento no EO e na mortalidade por sepse após o uso de elevadas doses de NAC. Possivelmente, este fato se deu pela sua capacidade em reduzir o ferro para sua forma cataliticamente ativa, favorecendo a reação de Fenton (SPRONG et al., 1998).

Na SARA, a administração da NAC tem demonstrado alguns efeitos protetores, restabelecendo níveis de glutathiona dentro dos granulócitos pulmonares (LAURENT et al., 1996) e, em fluido de lavado broncoalveolar (ORTOLANI et al., 2000). Spapen et al. (1998) em estudo com NAC, demonstraram que a monoterapia parece não mudar o curso natural de doenças complexas como a SARA. Entretanto, sugeriram que sua utilização mais precocemente, poderia ser útil reduzindo o dano induzido pelo EO. A SARA é uma síndrome clínica que não é exclusivamente induzida por oxidantes, e que tem uma fisiopatologia complexa envolvendo vias inflamatórias e não inflamatórias. Por este motivo, acredita-se que não exista um antioxidante ideal que possa bloquear todas essas vias, sendo mais provável pensar em uma combinação de antioxidantes associado à terapia de suporte já utilizada (RITTER, 2007).

Em outros estudos, desta vez com DPOC, foi verificado que a NAC mostrou-se capaz de reduzir a concentração de H_2O_2 no condensado de ar exalado de pacientes enfermos. Porém, não preveniu a deterioração da função pulmonar nem reduziu a frequência de exacerbações (DECRAMER et al., 2005). Na DPOC o principal antioxidante disponível para pacientes enfermos é a NAC. Ela pode reduzir a velocidade de declínio anual do volume expiratório forçado no primeiro segundo em pacientes clinicamente doentes (DOURADO et al., 2006). Alguns estudos em análise multicêntrica, não observaram nenhum efeito da NAC sobre o volume expiratório forçado no primeiro segundo de 523 pacientes acompanhados por três anos. Entretanto, a capacidade residual funcional mostrou-se significativamente reduzida no grupo que utilizou a NAC (DECRAMER et al., 2001). Segundo Cavalcanti e Bruin (2009), a NAC é um antioxidante relativamente fraco, suscetível à inativação pelo EO. É provável que substâncias com ação antioxidante mais potente e com maior estabilidade, que não participem do ciclo redox, ou ainda, uma associação entre antioxidantes, possam conduzir a um declínio significativo do EO, modificando a progressão da doença (CAVALCANTE; BRUIN, 2009).

Na hipertensão arterial pulmonar, a NAC tem demonstrado benefícios através de efeitos cardioprotetores e propriedades imunomodulatórias, atuando sobre o estresse oxidativo e a inflamação (CHAUMAIS et al., 2014).

Segundo estudo de Tepel et al. (2000), a terapia com NAC oral, foi capaz de prevenir a deterioração da função renal em pacientes portadores de IRC.

A NAC é a droga de escolha na terapia da insuficiência hepática induzida por paracetamol (ATKINSON, 2002). Ela tem inúmeras propriedades farmacológicas com benefícios potenciais para os pacientes criticamente enfermos: restauração do poder antioxidante celular por recuperar as reservas depletadas de glutatona; ser uma *scavenger* de radicais livres tanto diretamente ou como precursor GSH; vasodilatação e inibição da agregação plaquetária pelo aumento dos níveis de GMPc; e regenerar o óxido nítrico pela doação de sulfidril. Além disto, a NAC pode diminuir a ativação de NF- κ B com redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-8 e TNF α .

Evidências sugerem que indivíduos saudáveis que utilizaram doses baixas de NAC, como 1,2 g/dia, sofreram efeitos pró-oxidativos com aumento dos níveis de GSH oxidada (KLEINVELD et al., 1992). Devido a esta informação, o uso da NAC em pacientes saudáveis, não expostos a situações de EO, não é recomendado.

Deste modo, torna-se importante a busca de novos antioxidantes e/ou novas doses que possam atuar como agentes profiláticos e/ou terapêuticos, já que o EO tem sido relacionado com a patogênese de inúmeras doenças, dentre elas o *Cor pulmonale* e a insuficiência cardíaca, que são foco do presente estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comitê de Ética para Uso de Animais

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com “Guiding Principles in the Care and Uses of Animals” e aprovados sob registro CEUA/UENF 201/2013 pelo Comitê de Ética e Uso de Animais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

3.2 Local

O trabalho foi desenvolvido na Unidade de Experimentação Animal (UEA) e nos setores de Patologia Clínica e Morfologia do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (HV-UENF), no município de Campos dos Goytacazes/RJ. Uma parte do protocolo experimental *post mortem*, foi desenvolvida no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Laboratório Compartilhado (LABCOM), Ilha do Fundão, Rio de Janeiro/RJ.

3.3 Amostragem

O modelo experimental adotado foi o rato (*Rattus norvegicus*), por atender fisiologicamente ao propósito do estudo.

Foram utilizados cinquenta e sete ratos machos Wistar jovens, com cinquenta dias de idade, divididos em nove grupos (tabela 2) pesando 250g em média, oriundos do Biotério de Experimentação Animal de Ribeirão Preto (SP). Os animais foram aclimatados durante quinze dias e mantidos em caixas plásticas com medidas de 50 x 35 x 15 cm, sendo três animais por caixa (figuras 5 e 6). Todos os animais permaneceram em ambiente com temperatura controlada (20° C), ciclo “claro-escuro” de 12h, a uma umidade relativa de 70%. Água e ração comercial foram oferecidas *ad libitum*.

A evolução do peso corporal foi mensurada semanalmente, antes e após a administração da MCT, e antes e após terapia com NAC, através de balança digital.

Todos os procedimentos adotados com os animais estão de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética e Uso de Animais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.



Figura 5. Câmara e caixas de acondicionamentos dos ratos.
Arquivo pessoal, Biotério, UENF, 2013.



Figura 6. Caixas plásticas acondicionando os ratos.
Arquivo pessoal, Biotério, UENF, 2013.

3.4 Grupos Experimentais e Protocolo Terapêutico

Os animais foram distribuídos de acordo com os seguintes grupos experimentais: A – controle absoluto, S – sem indução com MCT e C – com indução com MCT; e protocolo terapêutico: placebo; NAC 10mg/kg; NAC 100mg/kg e 300mg/kg (tabela 2).

Tabela 2. Grupos experimentais de ratos induzidos experimentalmente a *Cor pulmonale* com MCT, e submetidos a diferentes protocolos terapêuticos com NAC. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

| GRUPOS | n |
|------------------|---|
| A - CONTROLE | 5 |
| S – PLACEBO | 5 |
| S – 10mg/kg NAC | 5 |
| S – 100mg/kg NAC | 5 |
| S – 300mg/kg NAC | 5 |
| C – PLACEBO | 8 |
| C - 10mg/kg NAC | 8 |
| C - 100mg/kg NAC | 8 |
| C - 300mg/kg NAC | 8 |

Legenda: * n (i) número inicial de animais; (S) sem indução com monocrotalina (MCT); C com indução MCT; (NAC) N-acetilcisteína. N = 57

Semanalmente foi oferecido 175g de ração/animal (25g/dia) (ANDRADE et al., 2006). Com isto foi possível controlar a média do consumo alimentar dos animais. A evolução do peso corporal foi mensurada semanalmente, antes e após a administração da MCT, e durante a terapia com NAC, com auxílio de uma balança digital. Diariamente, todos os animais receberam uma “massagem corporal” denominada *handley*, durante um minuto, com o objetivo de facilitar a manipulação e reduzir o estresse durante as atividades executadas.

3.5 Protocolo Experimental

Após a aclimatação, os animais foram induzidos experimentalmente a *Cor pulmonale* através da aplicação única de injeção *i.p.* da droga monocrotalina (Crotaline – C240 SIGMA) ($60\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Os animais pertencentes ao grupo experimental S, receberam uma injeção de solução salina pela mesma via, mesmo volume e sob as mesmas condições.

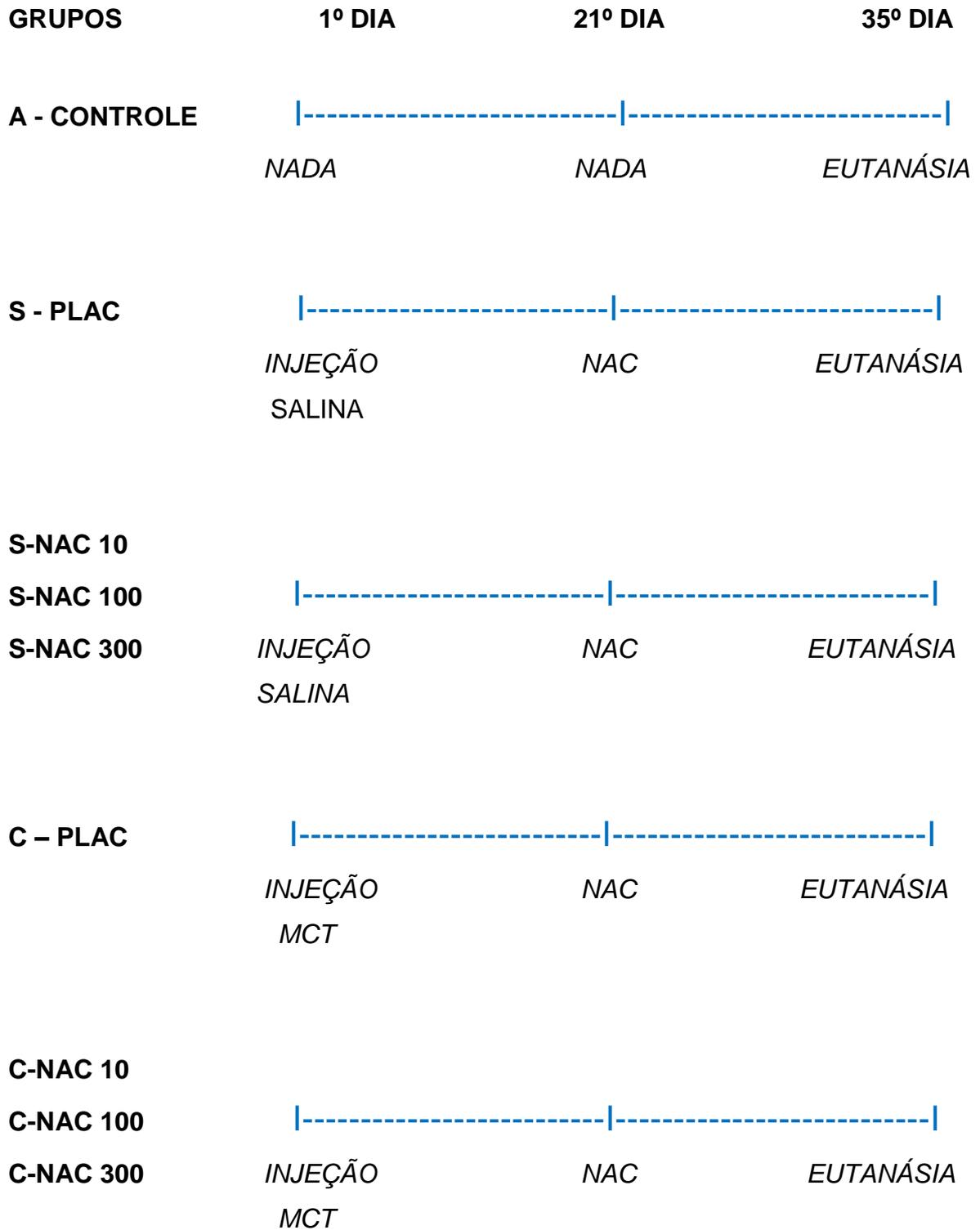
O período de indução teve a duração de vinte e um dias, sendo realizada diariamente a observação individual dos parâmetros clínicos de todos os animais. As alterações constatadas eram anotadas em fichas individuais para facilitar a posterior tabulação dos dados. Esta etapa foi executada sempre pelo mesmo observador.

Após os vinte e um dias de indução e estabelecimento do *Cp.*, os animais iniciaram terapia oral com NAC, por um período de quinze dias, através de gavagem. Os animais do grupo A - controle não receberam nenhum tipo de tratamento oral, e os animais do grupo placebo receberam na mesma frequência e volume, substância placebo composta por água e sorbato de potássio (conservante), para mimetizar e reproduzir o estresse sofrido pelos grupos induzidos.

3.6 Eutanásia

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, 24h após a última administração do protocolo terapêutico.

3.7 Desenho Experimental



3.8 Coleta de Material e Processamento: Bioquímica Sérica

As amostras de sangue venoso foram coletadas vinte quatro horas após a última administração do protocolo terapêutico através da veia da cauda, utilizando agulha hipodérmica (25 x 7 mm), seringas descartáveis de 3ml, e distribuídas em frascos sem EDTA. As amostras foram centrifugadas (1500g por 5 minutos), e uma alíquota do sobrenadante de no mínimo de 500 μ L foi separada. Em seguida, foram acondicionadas em microtubos tipo "Eppendorf" e mantidas sob refrigeração, à temperatura de -20°C , para posterior realização das análises: ALT, AST, FA, albumina, ureia, creatinina, CK e CK-MB, em equipamento espectrofotométrico semiautomatizado, da marca Microlab 200 - Merck, Vertrieb Diagnóstica, Darmstadt, Alemanha, utilizando-se kits comerciais da marca Labtest®. O processamento e a análise das amostras foram realizados no laboratório de Patologia Clínica da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

3.9 Hipertrofia Cardíaca

No 35^o dia, após terminar o período de terapia, os animais foram eutanasiados e os corações foram retirados sendo primeiramente pesados integralmente e logo após, os ventrículos direito e esquerdo mais o septo (V + S) foram pesados separadamente dos átrios. Por fim, o ventrículo direito foi pesado individualmente.

A hipertrofia cardíaca foi avaliada através da razão do peso cardíaco isolado (PCI) pelo peso corporal final (PCF), e a razão do peso do ventrículo direito (PVD) pelo peso S + VE (PSVE), expressos em g/mg e g/g.

3.10 Coleta de Material e Processamento: Anatomopatologia

Amostras viscerais e de órgãos colhidas nas necropsias foram encaminhadas ao Setor de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), onde seguiu o procedimento para entrada de material, incluindo ficha de entrada com os dados do animal, e do veterinário responsável, além do histórico clínico do animal.

O material colhido foi fixado em formalina neutra tamponada a 10%, por, no mínimo 48h e, posteriormente processado segundo técnicas histológicas de rotina.

As amostras foram clivadas e acondicionadas em cassetes histológicos devidamente identificados, submetidos ao processamento automático para as etapas de desidratação em banhos de alcoóis, clarificação ou diafanização em banhos de xilol, embebição em parafina, inclusão em parafina, seguido da microtomia, coloração usada na rotina, que foi a hematoxilina e eosina (H/E) e coloração especial picrosírius, e montagem das lâminas.

As lâminas foram analisadas sob microscopia óptica, onde se avaliaram as características morfológicas celulares e o padrão tecidual da lesão para fins de diagnóstico.

3.11 Preparação do Tecido Cardíaco: Análises Bioquímicas

O coração após ser removido e pesado, foi fragmentado, e parte deste foi utilizada para as análises bioquímicas.

O material foi colocado em cubeta de vidro com 1ml de solução tampão KPE (fosfato de potássio e EDTA) e levado a um homogenizador de tecido, com o objetivo de promover a lise do tecido e ruptura das células. Posteriormente, este material foi centrifugado a 2000g por 10 minutos, para que ocorresse a remoção dos núcleos e fragmentos celulares. O sobrenadante foi aspirado e transferido para tubos tipo ependorf, sendo avolumado para 1ml com solução de KPE, e congelado em freezer -70° C, para posterior análise da LPO e das enzimas antioxidantes.

3.12 Quantificação de Proteínas

A concentração de proteínas no homogeneizado de coração, ventrículo direito, foi estimada pelo método de Bradford, usando solução de albumina bovina (1mg/ml) como padrão.

Para as análises foi utilizado 1µl de amostra, e a leitura foi realizada em leitor de Elisa no comprimento de onda 595nm.

A concentração de proteínas foi expressa em µg/µl (BRADFORD, 1976).

3.13 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Esta técnica consiste em avaliar o grau de oxidação dos ácidos graxos em sistemas biológicos. O dano em lipídios de membrana é determinado pela formação de subprodutos da lipoperoxidação (malanoaldeído – MDA), que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBA) formadas durante a peroxidação em sistemas de membrana e microsomas. MDA reage com TBA gerando um produto colorido róseo lido em espectrofotômetro.

Foram coletadas 200 μ l de amostras e esse conteúdo foi adicionado de 200 μ l de TCA (ácido tricloroacético) 10%, agitado e resfriado a 4° C por 15 minutos. A centrifugação foi a 2.200g por 15 minutos, sendo recolhido 200 μ l do sobrenadante que foi incubado com uma solução de 200 μ l de TBA, em banho-maria (95° C) por 10 minutos. A leitura foi realizada em leitor de Elisa no comprimento de onda 532nm (DRAPER; HADLEY, 1990).

A concentração de TBARS foi expressa em nMol/mg proteína.

3.14 Atividade da Catalase (CAT)

Este teste consiste em medir a diminuição da absorbância no comprimento de onda a 240nm, que é onde ocorre maior absorção pelo peróxido de hidrogênio. Para a realização deste ensaio, foi preparado um “mix” composto por 10 ml de solução tampão fosfato (PBS) a 50mM (pH = 7,4) e 1,6ml de peróxido de hidrogênio 0,3 M. Foi utilizada uma placa UV, sendo colocado em cada poço 3 μ l de amostra e 97 μ l do “mix”, obtendo um volume final de 100 μ l para cada poço. A leitura foi realizada em leitor de Elisa, durante 60 segundos ($\Delta t = 30$ segundos), no comprimento de onda 240nm (AEBI, 1984).

Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

3.15 Atividade da Superóxido Desmutase (SOD)

Esta técnica consiste em avaliar a inibição da auto-oxidação da epinefrina. A taxa de auto-oxidação da epinefrina é progressivamente inibida por quantidades crescentes de SOD presente na amostra. Foi utilizada uma microplaca, sendo colocado em cada poço 1, 2 e 4 μ l de amostra mais 193ml de tampão glicina, 2 μ l de

catalase e 4µl de epinefrina. A leitura foi realizada em leitor de Elisa, durante 180 segundos ($\Delta t = 10$ segundos), no comprimento de onda 480nm.

Os resultados foram expressos em U/mg de proteína (MISRA; FRIDOVICH, 1972).

3.16 Delineamento Estatístico

Com base nos resultados, foram calculadas as médias e o erro padrão das médias para cada uma das medidas realizadas, e para cada um dos grupos estudados. Para as análises clínicas e anatomopatológicas, foi utilizada a estatística descritiva. Para as análises bioquímicas, utilizou Análise de Variância (ANOVA) de uma via complementada com o teste de comparação múltipla de médias Bonferoni's. O software GraphPad Prisma versão 5.0, foi utilizado como ferramenta computacional para análise estatística dos dados.

As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação Clínica

4.1.1. Sinais Clínicos

Na tabela 3 encontram-se dados referentes à frequência de sinais clínicos apresentados pelos ratos induzidos com MCT a C_p ., ao longo do período experimental.

Tabela 3. Frequência de sinais clínicos manifestados pelos ratos induzidos a *Cor pulmonale* com monocrotalina (MCT) e tratados com NAC durante o período experimental. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

| Variável | PLAC | Concentrações de NAC (mg/kg) | | | | FeOA | FeOR % |
|-------------------|------|------------------------------|-----|-----|-----------|------------|--------|
| | | 10 | 100 | 300 | | | |
| DPN | 8 | 8 | 8 | 8 | 32 | 100 | |
| FDG | 2 | 3 | 3 | 1 | 9 | 28 | |
| FARN | 1 | 2 | 3 | 3 | 9 | 28 | |
| CNS | 4 | 3 | 5 | 7 | 19 | 59 | |
| MHC | 3 | 1 | 4 | 1 | 9 | 28 | |
| PLA | 3 | 3 | 1 | 3 | 10 | 31 | |
| TAC | 4 | 4 | 2 | 2 | 12 | 37 | |
| DDT | 1 | 3 | 3 | 0 | 7 | 22 | |
| PMM | 5 | 6 | 8 | 2 | 21 | 65 | |
| RAP | 8 | 7 | 8 | 8 | 31 | 97 | |
| Nº inicial | 8 | 8 | 8 | 8 | 32 | - | |
| Óbitos | 1 | 2 | 3 | 3 | 9 | - | |

Legenda: (NAC) n-acetilcisteína; (PLAC) placebo (veículo composto por água e sorbato de potássio); (FeOA) frequência de observação absoluta; (FeOR) frequência de observação relativa; (DPN) dispneia; (FDG) fadiga; (FASN) fluido aerado róseo nas narinas; (CNS) cianose; (MHC) mucosa hipocorada; (PLA) pelo amarelado; (TAC) taquicardia; (DDT) desidratação; (PMM) perda de massa muscular; (RAP) redução de apetite.

De um modo geral, verificou que inúmeros sinais clínicos foram observados após a indução com MCT, sendo a dispneia e redução do apetite os mais frequentes, com percentuais de 100% e 97%, respectivamente. A perda de massa muscular, cianose e taquicardia também foram frequentemente observadas, seguidos por pelo amarelado (figura 7), fadiga, desidratação, fluido aerado sanguinolento nas narinas (figura 8) e mucosas hipocoradas. A frequência de surgimento do fluido aerado róseo nas narinas esteve diretamente relacionada com a ocorrência dos óbitos (tabela 3). É possível que nestes casos, a pressão pulmonar tenha se elevado para mais de 25 mmHg, permitindo a drenagem do plasma sanguíneo oriundo dos capilares pulmonares e a ocorrência de edema pulmonar, refletindo maior gravidade do quadro.



Figura 7. Imagem evidenciando a presença de pelos amarelados (seta).

Arquivo pessoal, Setor de Morfologia, UENF, 2013.



Figura 8. Imagem evidenciando presença de fluido aerado róseo nas vias aéreas (edema pulmonar).

Arquivo pessoal, Setor de Morfologia, UENF, 2013.

De acordo com Ricachinevsky e Amantéa (2006), seres humanos com HAP, independente da etiologia, não apresentam um quadro clínico específico. Os principais sinais estão relacionados com baixo débito cardíaco, como falha no crescimento, letargia, irritabilidade, taquipneia e taquicardia, além de algum grau de dispneia, fadiga, cefaleia e dor torácica, sendo esta provavelmente decorrente de isquemia ventricular direita.

Em animais, os sinais mais frequentes são dispneia, fadiga, intolerância ao exercício, cianose, tosse, estertores, crepitações e expiração prolongada (KELLUM, STEPIEN, 2008). Em ratos induzidos com MCT, os sinais clínicos de HAP são muito

semelhantes aos apresentados por seres humanos, sendo esta a grande vantagem deste modelo experimental (JASMIN et al., 2003). Hubscher (2005) e Ludke (2010) em estudo semelhante com ratos observaram uma maior ocorrência dos seguintes sinais clínicos: dispneia, perda de massa muscular, fadiga, cianose, pelos amarelados e quebradiços, além de agressividade, indo de encontro aos nossos resultados, exceto este último. No presente estudo, a agressividade não foi observada, possivelmente pela aplicação do *handley no* período de aclimação, tornando esses animais sociáveis e dóceis durante todo o experimento. A dispneia, cianose e a fadiga, principais sinais clínicos observados nesse estudo, estão diretamente relacionadas com a lesão pulmonar induzida, situação de hipóxia e inadequação da relação ventilação/perfusão pulmonar, frequentemente encontrado nos quadros de *Cp*. (RUBIN, 2004).

4.1.2 Consumo Alimentar e Peso Corporal

Nas tabelas 4 e 5 observou dados referentes ao consumo alimentar e peso corpóreo dos ratos pertencentes aos grupos experimentais S e com C indução por MCT.

Com relação ao consumo alimentar, observou que no período de aclimação, todos os animais mantiveram médias constantes de ingestão de ração. Este fato era esperado, uma vez que os animais foram oriundos de biotério confiável e encontravam-se clinicamente saudáveis. Já no período de indução, observou logo na primeira semana, uma redução progressiva no consumo alimentar dos animais pertencentes ao grupo C, acentuando-se a partir da quarta semana. Esses resultados assemelham-se com os dados de Leineweber et al (2000), que observaram dispneia e diminuição do consumo alimentar em ratos induzidos com MCT, entre a quarta e sexta semana de indução.

A diminuição do apetite e a perda de massa muscular são uns dos principais sinais relacionados com doenças cardiopulmonares. A alteração do pH sanguíneo decorrente de variações nas pressões parciais de oxigênio e gás carbônico também podem contribuir para a falta de apetite e o baixo ganho de peso (HUBSCHER, 2005).

Não foi observado neste estudo, efeito das diferentes doses de NAC sobre o consumo alimentar dos animais pertencentes ao grupo C. Contudo, a dose de

100mg/kg demonstrou as menores médias. Nenhum efeito foi observado sobre a variável consumo alimentar para os animais do grupo S, tratados com as diferentes doses de NAC.

Para a variável peso corpóreo, observou que no período de aclimatação todos os animais apresentaram ganho de peso progressivo, como era esperado, uma vez que os animais estavam em fase de crescimento. No período de indução, todos os animais permaneceram com ganho de peso, entretanto, no grupo C, essa proporção foi discretamente menor (tabela 5). No período da terapia, a partir da quarta semana (28º dia) pós-indução, os animais pertencentes ao grupo C apresentaram perda de peso, enquanto os animais do grupo S permaneceram ganhando peso. Este fato possivelmente está relacionado com a redução de apetite (tabela 4), a perda de massa muscular e desidratação, os sinais clínicos evidenciados nesses animais. A perda de peso foi mais acentuada a partir da quinta semana de indução. Os presentes resultados estão de acordo com Leineweber et al. (2000), Chen et al. (2001), Schermuly et al. (2004), Hubscher (2005) Rabbo et al. (2005), Maruyama et al., (2007) e Ludke (2010), os quais observaram perda de peso nos ratos portadores de HAP, vinte e oito dias após indução com MCT. As respirações rápidas e o esforço respiratório decorrentes da progressão da doença, também colaboram para aumentar o gasto energético, e conseqüentemente, reduzir o peso corpóreo (RUBIN, 2004).

Não foi observado neste estudo, efeito das diferentes doses de NAC sobre o peso corporal dos animais induzidos com MCT. Contudo, a dose de 300mg/kg demonstrou melhor resultado em relação à perda de peso, quando comparada às outras doses. Nenhum efeito foi observado sobre a variável peso corporal para os animais pertencentes ao grupo S, tratados com as diferentes doses de NAC.

Pode atribuir, portanto, a perda de peso corpóreo às conseqüências das alterações metabólicas geradas no organismo pela HAP, como dispneia, incremento do gasto energético e redução do apetite.

Segundo Belerenian (2003), para que haja o surgimento desses sinais clínicos, mais de 50% da área vascular pulmonar deve estar acometida. Logo, acredita que a determinação da HAP e conseqüente quadro de Cp. foi corretamente estabelecido através do protocolo adotado (Mathew et al., 1997), tendo em vista que nenhum dos animais do grupo controle apresentou qualquer sintomatologia clínica semelhante.

Tabela 4. Consumo alimentar (g, média \pm DP) de ratos Wistar induzidos a *Cor pulmonale* com MCT, e tratados com N-acetilcisteína (NAC) no período experimental. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

| Período (d) | | Concentrações de NAC (mg/kg) | | | | | | | | | |
|--------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--|
| | | Controle | PLAC* | PLAC | | 10 | | 100 | | 300 | |
| | | A | C | S | S | C | S | C | S | C | |
| ACLIAMATAÇÃO | 0 | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | |
| | 7 | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | |
| | 14 | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 24,50 ($\pm 0,53$) | |
| INDUÇÃO | 21 | 24,70 ($\pm 0,00$) | 23,50 ($\pm 0,11$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 24,00 ($\pm 0,85$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 22,30 ($\pm 2,46$) | 20,70 ($\pm 0,00$) | 21,60 ($\pm 0,75$) | |
| | 28 | 24,60 ($\pm 0,00$) | 21,15 ($\pm 1,44$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 21,50 ($\pm 1,07$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 22,70 ($\pm 0,75$) | 23,30 ($\pm 0,00$) | 21,05 ($\pm 0,16$) | |
| | 35 | 24,40 ($\pm 0,00$) | 22,45 ($\pm 0,16$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 21,60 ($\pm 0,43$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 23,40 ($\pm 1,50$) | 22,80 ($\pm 0,03$) | 22,05 ($\pm 0,05$) | |
| | 42 | 23,70 ($\pm 0,00$) | 20,05 ($\pm 2,19$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 28,00 ($\pm 0,00$) | 19,20 ($\pm 1,07$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 18,95 ($\pm 3,26$) | 23,30 ($\pm 0,00$) | 20,55 ($\pm 2,30$) | |
| 48 | 23,70 ($\pm 0,00$) | 16,75 ($\pm 0,80$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 28,30 ($\pm 0,00$) | 17,45 ($\pm 0,48$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 13,60 ($\pm 2,56$) | 25,00 ($\pm 0,00$) | 16,98 ($\pm 2,14$) | | |

*(PLAC) placebo (sorbato de potássio); (A) = controle absoluto; (C) com e (S) sem indução com monocrotalia

Tabela 5. Peso corporal (g, média \pm DP) de ratos Wistar induzidos a *Cor pulmonale*, com MCT e tratados com N-acetilcisteína (NAC) no período experimental. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

| Período (d) | | Concentrações de NAC (mg/kg) | | | | | | | | | |
|--------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--|
| | | Controle | PLAC* | PLAC | | 10 | | 100 | | 300 | |
| | | A | C | S | S | C | S | C | S | C | |
| ACLIAMATAÇÃO | 0 | 267,00 ($\pm 22,80$) | 259,37 ($\pm 11,16$) | 265,00 ($\pm 16,58$) | 244,00 ($\pm 10,84$) | 274,37 ($\pm 14,98$) | 278,00 ($\pm 20,49$) | 260,00 ($\pm 16,47$) | 265,00 ($\pm 16,58$) | 254,37 ($\pm 9,429$) | |
| | 7 | 287,00 ($\pm 21,09$) | 278,75 ($\pm 11,88$) | 287,00 ($\pm 21,09$) | 263,00 ($\pm 14,40$) | 293,75 ($\pm 14,33$) | 292,00 ($\pm 21,96$) | 278,75 ($\pm 18,27$) | 282,00 ($\pm 17,17$) | 268,75 ($\pm 9,91$) | |
| | 14 | 324,00 ($\pm 25,10$) | 301,87 ($\pm 15,80$) | 299,00 ($\pm 23,01$) | 288,00 ($\pm 14,40$) | 309,37 ($\pm 15,91$) | 299,00 ($\pm 24,34$) | 299,37 ($\pm 23,06$) | 307,00 ($\pm 15,65$) | 303,75 ($\pm 17,06$) | |
| INDUÇÃO | 21 | 348,00 ($\pm 27,97$) | 335,62 ($\pm 18,41$) | 331,00 ($\pm 26,87$) | 328,00 ($\pm 18,91$) | 346,25 ($\pm 12,46$) | 328,00 ($\pm 30,54$) | 325,62 ($\pm 27,44$) | 333,00 ($\pm 25,64$) | 320,62 ($\pm 20,95$) | |
| | 28 | 376,00 ($\pm 28,15$) | 348,12 ($\pm 23,89$) | 351,00 ($\pm 29,12$) | 341,00 ($\pm 24,08$) | 361,25 ($\pm 18,47$) | 348,00 ($\pm 42,22$) | 336,87 ($\pm 22,89$) | 356,00 ($\pm 27,02$) | 338,75 ($\pm 20,83$) | |
| | 35 | 395,00 ($\pm 33,17$) | 366,25 ($\pm 28,75$) | 390,00 ($\pm 35,17$) | 363,00 ($\pm 28,85$) | 381,87 ($\pm 16,89$) | 378,00 ($\pm 47,91$) | 368,12 ($\pm 25,34$) | 382,00 ($\pm 29,28$) | 355,62 ($\pm 18,60$) | |
| | 42 | 403,00 ($\pm 37,01$) | 365,62 ($\pm 30,87$) | 401,00 ($\pm 34,01$) | 399,00 ($\pm 29,02$) | 368,12 ($\pm 35,75$) | 394,00 ($\pm 51,77$) | 348,75 ($\pm 26,42$) | 399,00 ($\pm 28,37$) | 362,00 ($\pm 36,84$) | |
| 48 | 417,00 ($\pm 39,46$) | 352,86 ($\pm 34,38$) | 408,00 ($\pm 36,46$) | 426,00 ($\pm 33,05$) | 363,33 ($\pm 31,41$) | 411,00 ($\pm 35,95$) | 322,50 ($\pm 48,35$) | 401,00 ($\pm 25,84$) | 363,57 ($\pm 21,93$) | | |

*(PLAC) placebo (sorbato de potássio); (A) = controle absoluto; (C) com e (S) sem indução com monocrotalia

4.1.3 Mortalidade

O índice de mortalidade geral registrado nesse estudo foi de 17% (tabela 6), sendo todos pertencentes ao grupo C, a partir da terceira semana de indução. Todos os animais que vieram a óbito apresentaram sinais compatíveis com quadro de edema pulmonar, como dispneia e presença de fluido aerado róseo nas narinas, evidenciando hipóxia, progressão e gravidade do quadro (Figura 9).

Tabela 6. Número de óbitos de ratos Wistar induzidos a *Cor pulmonale* com monocrotalina e tratados com N-acetilcisteína (NAC) durante o período experimental. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

| Nº de animais | Concentrações de NAC (mg/kg) | | | | | | | | | Total(%) |
|----------------|------------------------------|-------|------|----|---|-----|---|-----|---|-----------------|
| | Controle | PLAC* | PLAC | 10 | | 100 | | 300 | | |
| | A | C | S | S | C | S | C | S | C | |
| Inicial | 5 | 8 | 5 | 5 | 8 | 5 | 8 | 5 | 8 | 57 (100) |
| Óbitos | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0 | 3 | 09 (16) |
| Final | 5 | 7 | 5 | 5 | 6 | 5 | 5 | 5 | 5 | 48 (84) |

* (PLAC) placebo; (A) controle absoluto; (C) com e (S) sem indução com monocrotalina.

O registro de óbito esteve presente em todos os grupos pertencentes ao grupo C. Nos grupos C 100 e 300mg/kg (tabela 6), o número de óbitos foi mais elevado. Segundo Cavalcanti e Bruin (2009), a NAC é um antioxidante relativamente fraco, suscetível à inativação pelo EO. Sprong et al. (1998) em estudos com sepse mostraram que houve um aumento no EO e na mortalidade após o uso de elevadas doses de NAC. Possivelmente, este fato se deu pela sua capacidade em reduzir o ferro para sua forma cataliticamente ativa, favorecendo a reação de Fenton. Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo, maior tendência à mortalidade, entretanto pouco consistentes. Desta forma, é precoce afirmar um efeito negativo na relação dose-efeito e sobrevida deste grupo, sendo necessária uma maior investigação a respeito de resultados dose-efeito antioxidante da NAC.

4.2 – Análises Bioquímicas

4.2.1 Marcadores Hepáticos

4.2.1.1 Alanina Aminotransferase (ALT)

Analisando os dados para o marcador ALT, verificou que valores mais elevados foram obtidos para os animais do grupo C-PLAC, quando comparado aos animais do grupo A, sendo este resultado significativamente estatístico ANOVA ($p \leq 0,05$) (figura 9). Os valores de média \pm erro padrão estão ilustrados na tabela 7.

Segundo Melo et al. (2012), os valores médios de referência para a enzima ALT em ratos Wistar machos são $48,4 \pm 6,46$, corroborando com nossos resultados para o grupo A - $47,20 \pm 3,97$. O que reflete condições de saúde adequadas do ponto de vista clínico para os animais utilizados em nosso experimento.

A ALT é uma enzima citossólica de caráter hepato-específica, que é utilizada na avaliação de lesão hepática em cães (AMARAL *et al.*, 1996). Seus valores mais elevados são encontrados no fígado, no pâncreas, nos eritrócitos, no coração, nos rins e nos músculos esqueléticos (KANEKO *et al.*, 2008).

Kaneko *et al.* (2008) afirmaram que o fígado tem importante atividade específica desta enzima, e um aumento na sua concentração sérica denota destruição ou necrose hepática, atuando como um sensível marcador. A elevação sérica de ALT está relacionada com o número de células envolvidas, ou seja, com a extensão, e não com a gravidade da lesão.

Savransky et al. (2009) verificaram que a hipóxia intermitente induzida pela apneia do sono, pode causar aumento nos níveis plasmáticos da ALT, assim como citomegalia de hepatócitos, aumento do glicogênio hepático e evidências de estresse oxidativo. Segundo Amaral *et al.* (1996), níveis séricos elevados da ALT indicam a existência de necrose ou aumento da permeabilidade dos hepatócitos por hipóxia e toxinas. Neste caso, é provável que níveis estatisticamente mais elevados de ALT encontrados no presente experimento, estejam correlacionados com esses dois fatores. O estabelecimento de *Cp*, que é uma síndrome que causa alterações na fisiologia cardiorrespiratória, produzindo uma ineficiência na oferta de oxigênio e em situações importantes de hipóxia (LUDKE, 2007); e a indução com MCT por poder causar necrose hepática periportal em ratos (WILSON et al., 1992). Embora Rabbo (2005), cite que uma única dose baixa de MCT, causa HAP e *Cp* em ratos sem a ocorrência de doença hepática associada.

Segundo Rodrigues *et al.* (2005), a ALT tem um pico de liberação sanguínea em torno de três ou quatro dias após a ocorrência da lesão, porém retorna aos

valores basais cerca de duas semanas depois. Aumentos discretos podem ser decorrentes de esteatose, já elevações moderadas a severas são observadas em situações de necrose celular, hepatite tóxica ou infecciosa e neoplasia. Segundo Allen e Mackin (2002), pacientes portadores de *Cp* ou com ICD, em situação de hipóxia e congestão hepática passiva, podem apresentar elevação discreta a moderada nos níveis séricos das transaminases hepáticas, indo de encontro com os resultados do presente estudo.

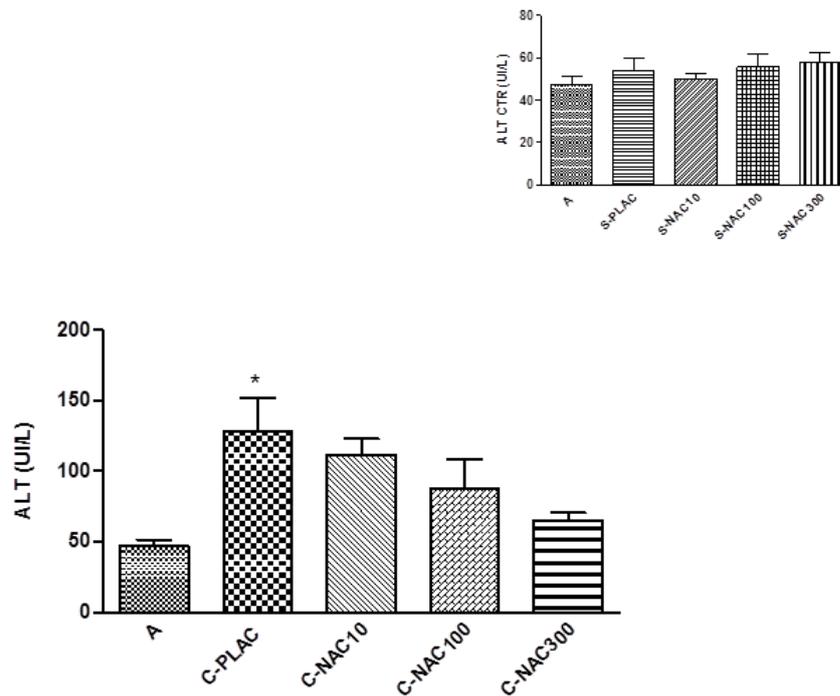
Não houve diferença significativa entre os animais do grupo C. Entretanto, foi observada, uma tendência progressiva na redução desses valores, sendo o grupo C-NAC300, o que apresentou resultado mais próximo ao do grupo A, sugerindo uma dose mais eficiente (figura 9).

O metabolismo da MCT acontece em duas etapas: uma no pulmão e outra no fígado. No fígado ocorre a conjugação da MCT e a glutathiona (GSH), que representa a reação de detoxificação. A NAC atua como uma pró-droga de cisteína, promovendo a biossíntese de GSH (ZAFARULLAH et al., 2003). E por este motivo, acredita que os níveis de ALT, apesar de não serem estatisticamente significativos, tenham reduzido no grupo C-NAC300 a partir deste mecanismo de ação.

Segundo Kelly (1998), após 12h de administração oral da NAC, níveis irrisórios da droga são observados no plasma, sendo recomendadas administrações a cada 8 a 12h. É possível que este fato tenha influenciado em nossos resultados, uma vez que optamos pela administração da droga a cada 24h.

Não foi observado nesse estudo, resultado estatisticamente significativo entre os grupos A e S (figura 9).

A NAC é uma droga segura e bem tolerada mesmo em doses elevadas, sendo os efeitos colaterais mais comumente relatados: náuseas, vômitos e outros distúrbios gastrintestinais. Raramente podem ocorrer reações de anafilaxia devido à liberação de histamina, causando erupções cutâneas, prurido, angioedema, broncoespasmos e taquicardia (KELLY, 1998). Nenhum desses efeitos foi observado nos grupos S e C tratados com NAC, corroborando com as citações deste autor.



* Significativamente diferente A versus C-PLAC ($P \leq 0,05$)

Figura 9. Níveis séricos de ALT (U/L) em ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em condições laboratoriais. Valores expressos em média (\pm erro padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5%. Gráfico em maior destaque - Eixo Y: concentrações séricas ALT (alanina aminotransferase); Eixo X: A (controle absoluto = SHAM), C (com indução de monocrotalina - MCT); PLAC (placebo – veículo composto por água e sorbato de potássio), C-NAC10 (MCT + 10mg/kg de n-acetilcisteína – NAC), C-NAC100 (MCT + 100mg/kg NAC) e C-NAC300 (MCT + 300mg/kg NAC); Gráfico em menor destaque – Eixo X: S (sem indução MCT- Salina); S-NAC10 (Salina +10mg/kg NAC), S-NAC100 (Salina +100mg/kg NAC) e S-NAC300 (Salina + 300mg/kg NAC); (n= 5-7; N= 43).

* Significativamente diferente quando comparado ao grupo A ($P \leq 0,05$).

4.2.1.2 Aspartato Aminotransferase (AST)

Para o marcador AST, verifica que valores mais elevados foram obtidos para os animais do grupo C-PLAC, quando comparado aos animais do grupo A, sendo este resultado significativamente estatístico ANOVA ($p \leq 0,05$) (figura 10). Os valores de média \pm erro padrão estão ilustrados na tabela 7.

Segundo Melo et al. (2012), os valores médios de referência para a enzima AST em ratos Wistar machos são $131,7 \pm 23,09$, corroborando com nossos resultados para o grupo A $118,20 \pm 9,68$. O que reflete condições de saúde adequadas do ponto de vista clínico para os animais utilizados em nosso experimento.

As mais elevadas concentrações desta enzima encontram-se principalmente nas células musculares esqueléticas, hepatócitos, coração e rins. Meyer *et al.* (1995) baseados em estudos humanos, demonstraram que aproximadamente 80% desta enzima que encontra-se no interior dos hepatócitos, está associada às mitocôndrias, e o restante encontra-se solúvel no citosol. E por este motivo elevadas concentrações séricas de AST podem refletir situações de lesão muscular (esquelético e cardíaco) e/ou lesão hepática (KANEKO, 2008). Neste estudo especificamente, suspeita-se das duas possibilidades, uma vez que a MCT pode causar necrose hepática periácinar em ratos (WILSON *et al.*, 1992); e lesão muscular, uma vez que instalado o quadro de *Cp*, ocorre uma redução do débito cardíaco e desvio do suprimento sanguíneo para órgãos mais nobres, como cérebro músculo e coração. Desta forma, a nutrição destinada à musculatura esquelética torna-se insuficiente para manter suas necessidades, produzindo um quadro de hipóxia tecidual e favorecendo a ocorrência de lesões. Além disto, o estabelecimento de *Cp* por MCT promove um quadro de hipóxia e EO gerando inflamação e morte celular, não só das células musculares cardíacas, mas de outros órgãos envolvidos como fígado, rim, pulmão e sistema nervoso (YAN, HUXTABLE, 1996).

Segundo Kaneko *et al.* (2008), apenas a mensuração sérica da ALT é insuficiente para se diagnosticar lesão hepática, sendo necessária a mensuração concomitante da AST. Por este motivo, mensurações conjuntas de ALT e AST foram avaliadas em nosso estudo, tendo apresentado comportamento semelhante entre os grupos. O que leva a acreditar na ocorrência de danos estruturais no fígado, a partir da indução de *Cp* com MCT, no período experimental.

A atividade sérica isolada da AST não é suficiente para diferenciar uma lesão hepatocelular de uma lesão muscular, sendo necessárias mensurações conjuntas com outras enzimas mais específicas como o sorbitol desidrogenase ou a creatina quinase (CK) (KANEKO *et al.*, 2008). Em nosso estudo, optamos pela mensuração da CK, mencionada em resultados futuros.

Não houve diferença significativa entre os animais do grupo C. Entretanto, foi observada, uma tendência progressiva na redução dos níveis de AST, que pode ser justificado pelos mesmos motivos para o marcador ALT, levando em consideração o metabolismo hepático *versus* mecanismo de ação da NAC, e ainda considerações feitas por Kelly (1998), que afirma a eficiência da droga, com administrações a cada 8 e 12h. Lembrando que optamos por administrações a cada 24h (Figura 10).

Não foi observado em nosso estudo, resultado estatisticamente significativo entre os grupos A e S para o marcador AST (figura 10). Assim como nenhum efeito colateral citado comumente quando administradas doses elevadas de NAC. Mas, observamos que todo o grupo S, apresentou médias superiores às do grupo A, mesmo não sendo estatisticamente significativa (tabela 7). Pode correlacionar este fato com os comentários feitos por Kleiveld et al. (1992), que lembram que a NAC por ser uma droga com potencial pró-oxidante, não é recomendada na ausência de situações de estresse oxidativo, podendo elevar os níveis de GSH oxidada. E talvez por este motivo, além de efeitos antioxidantes, pode observar na ausência do mesmo, efeitos pró-oxidantes.

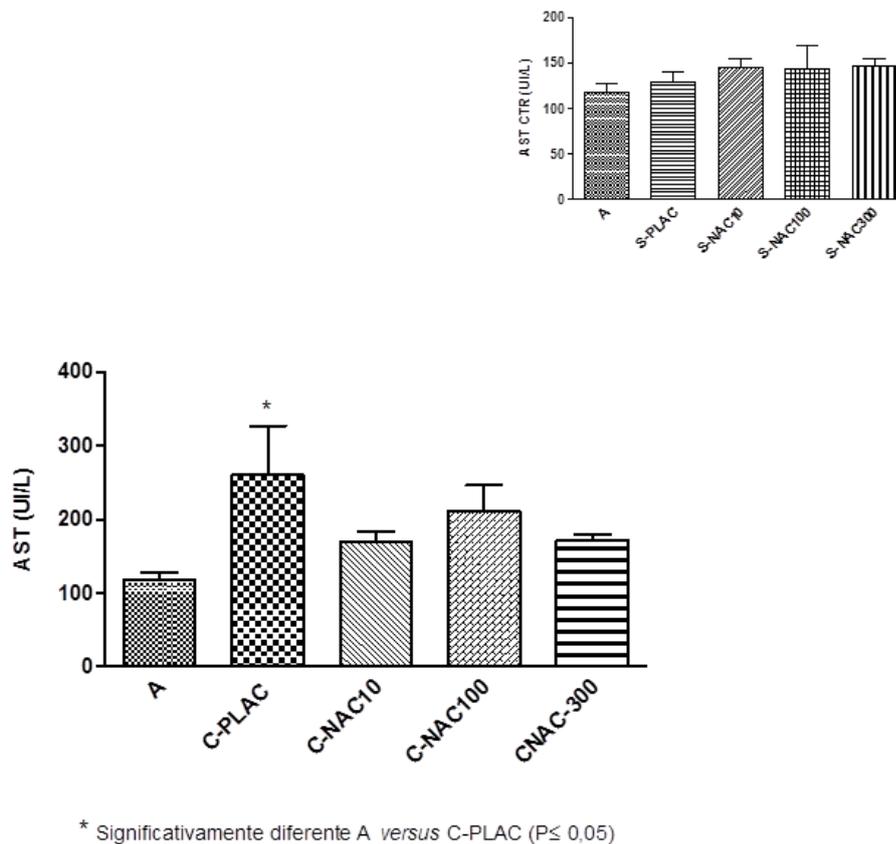


Figura 10. Níveis séricos de AST (UI/L) em ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em condições laboratoriais. Valores expressos em média (\pm erro padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5%. Gráfico em maior destaque - Eixo Y: concentrações séricas AST (aspartato aminotransferase); Eixo X: A (controle absoluto = SHAM), C (com indução de monocrotalina - MCT); PLAC (placebo - veículo composto por água e sorbato de potássio), C-NAC10 (MCT + 10mg/kg de n-acetilcisteína - NAC), C-NAC100 (MCT + 100mg/kg NAC) e C-NAC300 (MCT + 300mg/kg NAC); Gráfico em menor destaque - Eixo X: S (sem indução MCT- Salina); S-NAC10 (Salina +10mg/kg NAC), S-NAC100 (Salina +100mg/kg NAC) e S-NAC300 (Salina + 300mg/kg NAC); (n= 5-7; N= 43).

* Significativamente diferente quando comparado ao grupo A (P ≤ 0,05).

Tabela 7. Comparação entre médias (\pm Erro Padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5% ($P \leq 0,05$) para as variáveis bioquímicas sérica de ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em condições laboratoriais (n = 5 – 7; N= 43). Setor de Patologia Clínica/UENF, 2013.

| Grupos | A | | C | | | S* | | | |
|---------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------|-------------|--------------|--------------|
| | CONTROLE | PLAC | NAC 10mg | NAC 100mg | NAC 300mg | PLAC | NAC 10mg | NAC 100mg | NAC 300mg |
| ALT | 47.20 ^b | 128.20 ^a | 111.0 ^{ab} | 87.33 ^{ab} | 65,25 ^{ab} | 53.67 | 50.00 | 55.75 | 57,80 |
| (U/I) | (3.97) | (23.69) | (11.91) | (21.43) | (5,18) | (5.84) | (2.45) | (6.24) | (4,45) |
| AST | 118.2 ^b | 260,80 ^a | 169.8 ^{ab} | 210.7 ^{ab} | 172,50 ^{ab} | 129.3 | 145.3 | 143.3 | 146,00 |
| (U/I) | (9.68) | (66,78) | (14.53) | (36.41) | (6,71) | (10.48) | (9.39) | (25.67) | (8,6) |
| FA | 244,50 ^a | 229,00 ^a | 232,30 ^a | 199,00 ^a | 209,70 ^a | 198,30 | 221,00 | 241,00 | 228,76 |
| (U/I) | (14,05) | (31,33) | (16,00) | (32,96) | (36,50) | (8,57) | (15,82) | (8,11) | (10,95) |
| ALB | 2,63 ^a | 2,49 ^a | 2,40 ^a | 2,42 ^a | 2,62 ^a | 2,75 | 2,50 | 2,44 | 2,68 |
| g/dL | (0,07) | (0,05) | (0,14) | (0,14) | (0,18) | (0,04) | (0,04) | (0,11) | (0,06) |
| URE | 48,50 ^a | 67,00 ^a | 57,25 ^a | 60,50 ^a | 54,60 ^a | 47,40 | 42,80 | 46,33 | 44,40 |
| mg/dL | (1,94) | (7,36) | (5,36) | (3,17) | (4,82) | (2,25) | (2,03) | (2,19) | (1,60) |
| CREA | 0,49 ^b | 0,68 ^a | 0,52 ^b | 0,51 ^b | 0,53 ^b | 0,51 | 0,48 | 0,48 | 0,46 |
| mg/d/L | (0,02) | (0,05) | (0,03) | (0,04) | (0,02) | (0,04) | (0,04) | (0,03) | (0,02) |
| CK | 2.842 ^{ab} | 3.793 ^a | 3.729 ^a | 3,155 ^{ab} | 1,739 ^b | 2.787 | 3.904 | 3.906 | 3.755 |
| (U/I) | (186,09) | (216,4) | (438,5) | (444,9) | (348,02) | (147,4) | (344,4) | (448,1) | (383,20) |
| CK-MB | 573.30 ^{ab} | 651.0 ^a | 650.0 ^a | 437.8 ^b | 491,00 ^{ab} | 651.30 | 657.30 | 661.70 | 639,30 |
| (U/I) | (19.68) | (49.43) | (36.45) | (48.03) | (38,35) | (26.77) | (5.46) | (20.38) | (8,35) |

Legenda: A = controle absoluto; S = animais sem indução com monocrotalina (MCT) - Salina; C = animais com indução com MCT; PLAC = placebo (solução sorbato de potássio); NAC10, 100 e 300 = N-acetilcisteína 10mg/kg, 100mg/kg e 300mg/kg; ALT = alaninaaminotransferase (U/I = unidades internacionais); AST = aspartatoaminotransferase; FA = fosfatase alcalina; CK = creatinofosfoquinase; CK-MB= creatinofosfoquinase fração cardíaca. Médias seguidas pela mesma letra (A versus grupos C) não diferem entre si, segundo o teste de Bonferroni's ($P \leq 0,05$). * Médias não diferem entre si (A versus grupos S) segundo o teste de Bonferroni's ($P \leq 0,05$).

4.2.1.3 Fosfatase Alcalina (FA)

Para o marcador FA, em todos os grupos propostos, não houve diferença significativa ANOVA ($p \leq 0,05$) entre os resultados obtidos. Os valores de média \pm erro padrão estão ilustrados na tabela 7.

A FA é uma enzima ligada à membrana celular que pode ser produzida em diversos tecidos do organismo, como ossos, intestinos e sistema hepatobiliar, na forma de isoenzima, sendo que no fígado está localizada primariamente na membrana canalicular da bile. Pode ser encontrada também na mucosa gastrintestinal e em menor concentração nos rins, na placenta e no baço (KANEKO *et al.*, 2008), sendo utilizada como indicador de injúria hepática e biliar (AMARAL *et al.*, 1996; KANEKO *et al.*, 2008).

As isoenzimas de importância diagnóstica são de origem óssea e do sistema hepatobiliar, uma vez que as mesmas apresentam meia-vida maior do que as demais. Portanto, aumentos na atividade sérica desta enzima, geralmente são de origem hepatobiliar, exceto em pacientes em crescimento ou com patologias ósseas (MEYER *et al.*, 1995).

Apesar de não ter obtido resultados estatísticos significativos para a FA em nenhum dos grupos avaliados, as médias obtidas para este marcador no grupo A ($244,50 \pm 14,05$ UI/L) foram acima da média citada por Melo *et al.*, (2012) quando estabeleceram parâmetros bioquímicos de referência para ratos Wistar machos ($127,1 \pm 35,55$ UI/L). A FA é uma enzima de indução e para que sua atividade sérica esteja aumentada, é necessário que haja um aumento em sua produção tecidual (AMARAL *et al.*, 1996). Em nosso estudo utilizamos ratos em fase de crescimento, logo é esperado que níveis mais elevados desta enzima fossem registrados. Assim, a FA não deve ser utilizada como exame complementar no diagnóstico de animais que estejam em fase de desenvolvimento (CENTER *et al.*, 1993), como em nosso estudo.

A FA além de não ser um marcador específico de lesões hepáticas, ele apresenta uma elevada variância entre indivíduos de mesma espécie e raça, tendendo a uma baixa significância nos resultados. E por estes motivos, sugerimos a não utilização deste marcador em experimentos semelhantes.

4.2.1.4 Albumina

Para o marcador albumina, em todos os grupos propostos, não houve diferença significativa ANOVA ($p \leq 0,05$) entre os resultados obtidos. Os valores de média \pm erro padrão estão ilustrados na tabela 7.

Segundo Melo et al. (2012), os valores médios de referência para albumina em ratos Wistar machos são $3,0 \pm 0,12$, semelhante aos nossos resultados para o grupo A ($2,63 \pm 0,07$). O que reflete condições de saúde adequadas do ponto de vista clínico para os animais utilizados em nosso experimento.

A albumina é a principal proteína presente no plasma humano, constituindo cerca de 35 a 50% da proteína sérica total. É sintetizada exclusivamente no fígado, no citoplasma dos hepatócitos, com média de produção diária de 120 a 200 mg/Kg de peso, e tempo médio de síntese de 20 minutos (KANEKO, 2008). A taxa de síntese da albumina é controlada pela pressão osmótica coloidal, embora possa ser influenciada também por alguns hormônios como insulina, tiroxina e cortisol (EVANS, 2002). Dois terços da albumina corporal estão no compartimento extravascular, e apenas um terço no setor intravascular. Seu peso molecular é de 66.4 daltons (KANEKO, 2008).

Sendo o fígado o único local de síntese da albumina, quadros de hipoalbuminemia são indicativos de doença hepática grave (KANEKO, 2008). Em nosso estudo, níveis séricos adequados desta proteína foram determinados, refletindo a integridade funcional hepática de ratos induzidos experimentalmente com MCT a *Cor pulmonale*. A albumina também pode estar diminuída em situações de perda proteica, como nos casos de doença renal, doença gastrintestinal e quadros importantes de parasitismo intestinal (GRAUER, 2005). Essa informação associada aos nossos resultados para ureia e creatinina, nos levam a acreditar que houve uma relação direta com a redução do fluxo renal, e não dano estrutural, pelo menos neste momento. Entretanto, com a progressão da doença, é possível que lesões mais graves viessem a se instalar, ocorrendo perda proteica e níveis reduzidos de albumina.

As principais funções biológicas da albumina são o transporte e armazenamento de uma grande variedade de moléculas e ligantes, a manutenção da pressão oncótica do plasma, e como fonte de aminoácidos endógenos (KANEKO, 2008). Além disto, a albumina ainda apresenta função antioxidante, uma vez que possui um resíduo de cisteína exposto, que não forma ponte de dissulfeto. Esta cisteína livre atua como *scavengers* de oxigênio reativo e peroxinitrito sendo um importante antioxidante encontrado na circulação (ANRAKU et al., 2008).

A albumina é uma proteína de fase aguda negativa e sua concentração cai gradualmente durante processos infecciosos e inflamatórios. Em nosso estudo,

trabalhamos com análises na fase crônica da doença e talvez por este motivo não tenhamos observado tal efeito.

Não foi observado em nosso estudo, resultado estatisticamente significativo entre os grupos A e S para albumina. Assim como nenhum efeito colateral citado comumente quando administradas doses elevadas de NAC.

4.2.2 Marcadores Renais

4.2.2.1 Ureia

Para o marcador ureia, em todos os grupos propostos, não houve diferença significativa ANOVA ($p \leq 0,05$) entre os resultados obtidos. Os valores de média \pm erro padrão estão ilustrados na tabela 7.

Segundo Dantas et al. (2006), os valores médios de referência para a ureia em ratos Wistar machos são $48,00 \pm 7,6$, corroborando com nossos resultados para o grupo A – controle $47,00 \pm 1,73$. O que reflete condições de saúde adequadas do ponto de vista clínico para os animais utilizados em nosso experimento.

A Ureia é um composto orgânico nitrogenado formado no fígado e eliminado pelos rins, a fim de excretar o excesso de amônia do organismo (MEDWAY *et al.*, 1973). Ela constitui 45% do nitrogênio não proteico presente na circulação sanguínea e serve como um marcador preditivo da insuficiência renal sintomática e no estabelecimento de um diagnóstico diferencial (MOTTA, 2000).

A ureia é um soluto permeável, sendo transportada a partir do fígado e se difunde de forma passiva a todos os compartimentos líquidos do organismo. Na luz intestinal, ela é hidrolisada em amônia por bactérias produtoras de urease, ganhando a circulação, sendo reabsorvidas e posteriormente reconvertidas em ureia pelo fígado. Sua excreção se dá principalmente pelos rins, porém nem toda ureia filtrada é eliminada na urina. Isto porque a reabsorção passiva da ureia ocorre nos túbulos renais, logo sua concentração depende da velocidade de filtração glomerular e das alterações na velocidade do fluxo urinário (OLIVEIRA, 2007). Apesar de não obter neste estudo resultado significativamente estatístico para ureia, observou média mais elevada para o grupo C-PLAC quando comparado aos demais grupos, excedendo os parâmetros de normalidade para este marcador (tabela 7). Tal fato pode sugerir alterações na taxa de filtração glomerular, uma vez que a IC

estabelecida nos quadros de *Cor pulmonale* pode gerar diminuição no débito cardíaco. O mesmo não observou nos grupos C tratados com NAC (10, 100 e 300), havendo um decréscimo nessas médias, sendo o grupo C-NAC300, o que obteve média igual ao grupo A.

Rotineiramente para mensurar os níveis séricos de ureia utiliza-se o soro, tendo esta, pouca ou nenhuma toxicidade até que suas concentrações excedam os limites de normalidade em caso de insuficiência renal (KANEKO *et al.*, 2008).

Níveis de ureia abaixo da normalidade podem estar associados com quadros de hepatopatia grave. Uma vez lesado, o fígado torna-se incapaz de transformar a amônia em ureia, ficando essa em níveis elevados na circulação sanguínea (MOTTA, 2000). Desta forma, nossos resultados para o marcador ureia associado aos resultados de albumina, ALT e AST, reforçam nossa suspeita de que o estabelecimento de *Cor pulmonale* induzido por MCT, resulta em dano hepático estrutural e não funcional.

4.2.2.2 Creatinina

Para o marcador creatinina, verificou que valores mais elevados foram obtidos para os animais do grupo C-PLAC, quando comparado aos animais do grupo A, sendo este resultado significativamente estatístico ANOVA ($p \leq 0,05$) (figura 11). O mesmo acontece entre os grupos C-PLAC *versus* grupos C tratados com NAC (10, 100 e 300). Os valores de média \pm erro padrão estão ilustrados na tabela 7.

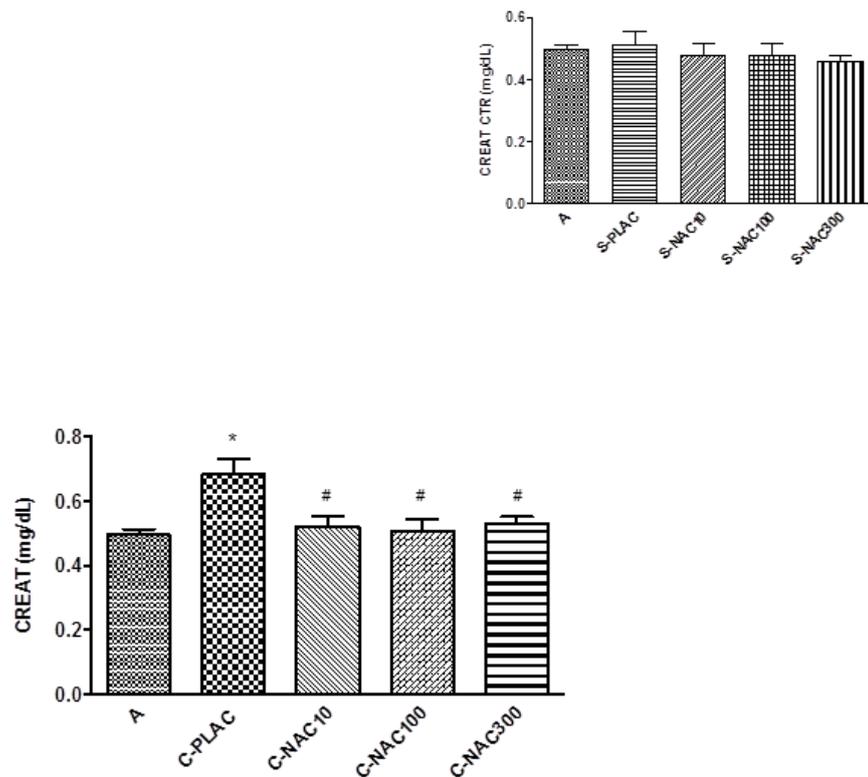
Segundo Mello *et al.* (2012), os valores médios de referência para creatinina em ratos Wistar machos são $0,5 \pm 0,05$, corroborando com nossos resultados para o grupo A ($0,49 \pm 0,02$) (tabela 7). O que reflete condições de saúde adequada do ponto de vista clínico para os animais utilizados em nosso experimento.

A creatinina é uma substância formada no tecido muscular e distribuída de maneira uniforme nos líquidos orgânicos (COLES, 1986). Segundo Motta (2000), a creatinina também pode ser sintetizada nos rins, no fígado e no pâncreas, sendo transportada para as células musculares e o cérebro, onde é fosforilada em creatinina-fosfato.

A creatinina é produzida, em taxa constante, como produto residual do metabolismo muscular. Ela é filtrada pelo glomérulo, sem absorção ou secreção tubular subsequente, então seus níveis séricos podem ser utilizados para avaliar a

taxa de filtração glomerular (AIELLO, 2001). Para que a creatinina seja utilizada como marcador de disfunção renal, é necessário que haja um entendimento em relação à sua excreção, uma vez que a mesma pode ser eliminada por via urinária, sudorese e vômito. Sua filtração ocorre através dos glomérulos permitindo concentrações urinárias e plasmáticas iguais. O processo de secreção se dá por transporte ativo, assim a secreção tubular não sofre influência da velocidade do fluxo urinário (KANEKO *et al.*, 2008). De forma semelhante à ureia, uma redução na taxa de filtração glomerular culmina com elevações séricas de creatinina (MEYER *et al.*, 1995). Portanto, pode sugerir que uma redução no débito cardíaco, secundário a um quadro de IC, possa ser o responsável pelos resultados encontrados em nosso estudo, uma vez que pode afetar a taxa de filtração glomerular.

A concentração sérica da ureia fornece importante índice de avaliação renal, quando associada à mensuração sérica de creatinina (COLES, 1986; KANEKO *et al.*, 2008). Por este motivo optou pela mensuração conjunta desses marcadores. Com base em nossos resultados para ureia e creatinina, pode sugerir que, o quadro de *Cor pulmonale* induzido por MCT, resulta em azotemia pré-renal, no período experimental de 35 dias. Associado a isto, pode sugerir ainda com base nos resultados para albumina, que não houve dano renal estrutural, como por exemplo, lesão tubular, justificando perda proteica. Além disto, todas as doses de NAC utilizadas nos grupos C tratados (10, 100 e 300) para creatinina apresentaram efeito positivo, aproximando-se das médias obtidas para o grupo A (figura 11), sugerindo eficiência terapêutica desta droga em casos de azotemia pré-renal secundária a *Cor pulmonale*. A NAC atua como uma pró-droga de cisteína, favorecendo a biossíntese de GSH, um tripeptídeo essencial para manter a integridade celular contra a ação dos radicais livres (ZAFARULLAH *et al.*, 2003).



* Significativamente diferente A versus C-PLAC ($P \leq 0,05$)
 # Significativamente diferente C-PLAC versus C-NAC10, C-NAC100 e C-NAC300 ($P \leq 0,05$)

Figura 11. Níveis séricos de creatinina (mg/dL) em ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em condições laboratoriais. Valores expressos em média (\pm erro padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5%. Gráfico em maior destaque - Eixo Y: concentrações séricas CREAT (creatinina); Eixo X: A (controle absoluto = SHAM), C (com indução de monocrotalina - MCT); PLAC (placebo - veículo composto por água e sorbato de potássio), C-NAC10 (MCT + 10mg/kg de n-acetilcisteína - NAC), C-NAC100 (MCT + 100mg/kg NAC) e C-NAC300 (MCT + 300mg/kg NAC); Gráfico em menor destaque - Eixo X: S (sem indução MCT- Salina); S-NAC10 (Salina +10mg/kg NAC), S-NAC100 (Salina +100mg/kg NAC) e S-NAC300 (Salina + 300mg/kg NAC); (n= 5-7; N= 43).

* Significativamente diferente quando comparado ao grupo A ($P \leq 0,05$).

Significativamente diferente quando comparado ao grupo C-PLAC ($P \leq 0,05$).

4.2.3 Marcadores Tecido Muscular (Esquelético e Cardíaco)

4.2.3.1 Creatinofosfoquinase (CK)

Para o marcador CK, verificou que valores mais elevados foram obtidos para os animais do grupo C-PLAC, quando comparado aos animais do grupo C-NAC300, sendo este resultado significativamente estatístico ANOVA ($p \leq 0,05$) (figura 12). O mesmo acontece entre os grupos C-NAC10 versus C-NAC300. Os valores de média \pm erro padrão estão ilustrados na tabela 7.

Não foi encontrado na literatura consultada, médias para a enzima CK na espécie por nós adotada. Por este motivo, a média utilizada como parâmetros de normalidade será do nosso grupo controle, por considerarmos animais em condições de saúde adequada do ponto de vista clínico ($2.842 \pm 186,09$). Teruya (2006), em trabalho sobre isquemia e reperfusão de músculo esquelético em ratos, encontrou para seus controles, média de CK muito inferiores às encontradas por nós ($751,00 \pm 130,79$). Segundo Aktas et al. (1994), os valores de referência para a atividade sérica de CK são mais elevados em cães com menos de um mês de idade e seu declínio ocorre até o animal obter um ano de idade. Para cães de pequeno porte, o valor de referência é quase duas vezes maior em comparação com cães de grande porte. Como em ratos, ainda não tem muitas informações disponíveis a respeito de parâmetros de normalidade para esta enzima, acredita que o fator idade e tamanho corporal possam estar contribuindo para níveis séricos mais elevados em nossos animais, uma vez que trabalhamos com ratos jovens e em fase de crescimento.

A CK é uma molécula constituída por duas subunidades, M e B, que são imunologicamente distintas e codificadas por genes diferentes. Possui a função de tornar adenosina trifosfato (ATP) disponível para a contração muscular, por meio da fosforilação de adenosina difosfato (ADP) e creatina fosfato (LOPES *et al.*, 2005). A CK é primariamente encontrada no citoplasma, no entanto, há uma pequena porcentagem encontrada na forma mitocondrial (KANEKO, 2008).

A maior quantidade de dados sobre a CK em espécies domésticas está disponível para cães. Esta espécie tem sido frequentemente utilizada como modelo experimental para a doença miocárdica em seres humanos. Há evidências de diferenças percentuais entre raças, com maior atividade de CK no músculo esquelético de cães galgos do que em vira-latas, e maior atividade de CK em músculos de ação rápida do que em músculos de contração lenta (GUY, SNOW, 1981; LINDENA et al., 1982).

A Atividade da CK está presente em maior concentração no músculo esquelético, seguido por músculo cardíaco, diafragma e cérebro (KANEKO, 2008). Santos (2005) e Dias (2008) citaram a formação de três isoenzimas citoplasmáticas de CK: MM encontrada no músculo estriado esquelético; BB no tecido cerebral e sistema digestório e a forma híbrida, MB, encontrada no músculo cardíaco, nos rins, no intestino e nos pulmões.

Geralmente a elevação sérica de CK ocorre devido a danos nas células musculares, resultado de um estresse físico (KANEKO, 2008). Segundo Yan e Huxtable (1996), o estabelecimento de Cp por MCT promove um quadro de hipóxia e EO gerando inflamação e morte celular, não só das células musculares cardíacas, mas de outros órgãos envolvidos como fígado, rim, músculo esquelético, pulmão e sistema nervoso. Em nosso estudo, apesar dos níveis séricos da CK estarem mais elevados no grupo C-PLAC quando comparado ao grupo A, não foi o suficiente para gerar um resultado estatisticamente significativo. Portanto, a MCT apesar de estabelecer um quadro de *Cor pulmonale* com hipertrofia de VD e IC, não foi capaz de gerar danos musculares importantes no período experimental de trinta e cinco dias. É possível que em períodos maiores de indução, resultados diferentes possam ser obtidos. Outro ponto a ser considerado é a meia-vida desta enzima no sangue, que é muito curta em todas as espécies. Em cavalos, a atividade sérica da CK ocorre cerca de 4 a 6 horas após lesão muscular e diminui muito rapidamente com uma meia-vida no soro de cerca de cento e oito minutos (VALBERG et al.,1993). A meia-vida da CK a partir de extratos do miocárdio de cães é de 2 a 3 horas. (SOBEL et al.,1977). A meia-vida média de solução de CK a partir de músculo esquelético de cães é de 2,6h (AKTAS et al., 1995). Esta meia-vida pode ser clinicamente relevante, uma vez que reflete melhor a fonte de CK no sangue após uma lesão muscular. Em nosso estudo, trabalhamos com uma patologia crônica, com período de indução de vinte e um dias. É possível que níveis mais elevados de CK tenham sido liberados nas fases mais iniciais da doença.

Segundo Fascetti et al. (1997), o aumento da atividade sérica de CK em gatos pode estar associado com quadro de anorexia, sugerindo um importante marcador de estado nutricional nesta espécie. Eles observaram que a atividade de CK aumenta a partir do catabolismo muscular secundário à diminuição da ingestão calórica, e que diminui significativamente dentro de 48h a partir de suplementação nutricional. É possível, que estes dados apesar de terem sido observados em gatos, também possam explicar nossos resultados, uma vez que os animais induzidos com MCT, tiveram uma redução considerável nos níveis de ingestão calórica, aumentando a taxa de catabolismo proteico, danos musculares e oxidantes. Uma vez administrado a NAC, observamos que as médias para esta enzima sofreram redução importante, com resultados estatisticamente significativos na dose de 300mg/kg (tabela 7), quando comparado aos grupos C-PLAC e C-NAC10. É possível

que a ação antioxidante da NAC explique tais resultados, uma vez que ambas as situações, *Cor pulmonale* e anorexia, elevam os níveis de oxidantes, gerando inflamação e morte celular, em diversos órgãos, incluindo o coração e músculo esquelético (YAN, HUXTABLE, 1996; FEOLI et al., 2006). A NAC atua como uma pró-droga de cisteína, favorecendo a biossíntese de GSH, e consequente proteção celular contra a ação dos oxidantes (ZAFARULLAH et al., 2003).

Em todas as espécies, a CK tem vantagens sobre a AST por ser mais específica para a lesão muscular, e não ser afetada mediante danos hepatocelulares. Porém, a meia vida curta dessa enzima tende a reduzir a sensibilidade do teste diagnóstico, oferecendo um meio eficaz de monitoramento da resposta à terapia. Portanto, nossos resultados para CK associados aos resultados de AST, apontam dano hepatocelular, mas não podemos afirmar o envolvimento de dano muscular. São necessários maiores estudos a respeito deste tema.

No entanto, a atividade de CK em si, não proporciona informação relativa à etiologia da lesão. Informações mais precisas a esse respeito podem ser obtidas pelo uso de análise histológica e histoquímica, a partir de biópsias musculares.

Não foi observado em nosso estudo, resultado estatisticamente significativo entre os grupos A e S (placebo, 10, 100 e 300) para o marcador CK (figura 12). Entretanto, observamos que todo o grupo S, apresentou médias superiores às do grupo A, mesmo não sendo estatisticamente significativa (tabela 7). Podemos correlacionar este fato com os comentários feitos por Kleinveld et al. (1992), que lembram que a NAC por ser uma droga com potencial pró-oxidante, não é recomendada na ausência de situações de estresse oxidativo. E talvez por este motivo, além de efeitos antioxidantes, podemos observar na ausência do mesmo, efeitos pró-oxidativos.

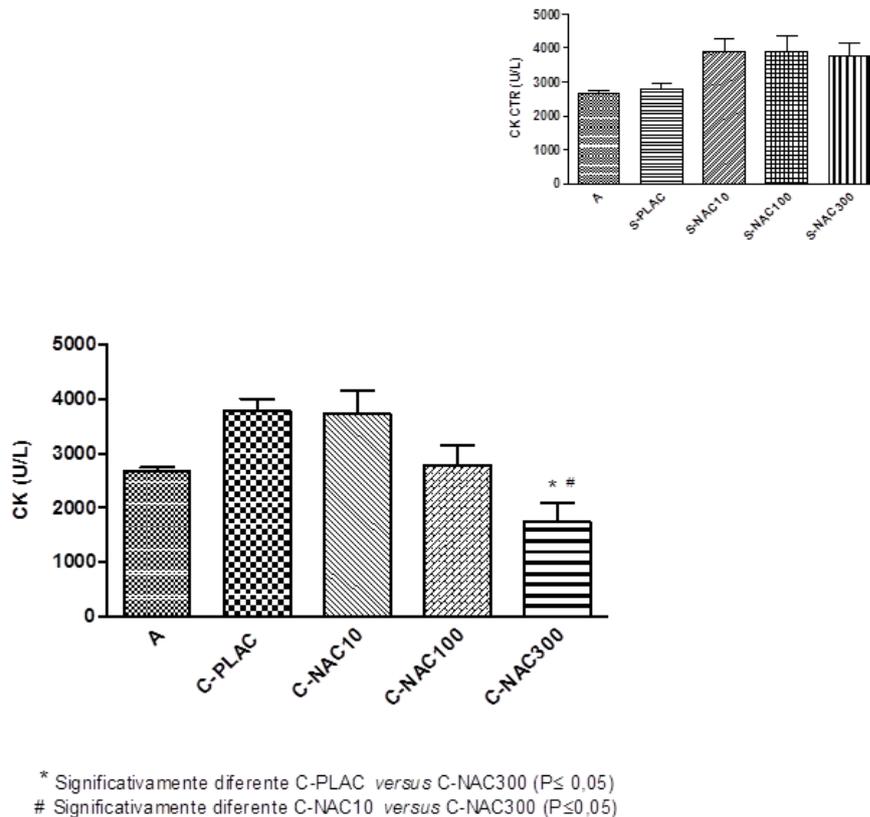


Figura 12. Níveis séricos de CK (U/L) em ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em condições laboratoriais. Valores expressos em média (\pm erro padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5%. Gráfico em maior destaque - Eixo Y: concentrações séricas CK (creatinofosfoquinase); Eixo X: A (controle absoluto = SHAM), C (com indução de monocrotalina - MCT); PLAC (placebo – veículo composto por água e sorbato de potássio), C-NAC10 (MCT + 10mg/kg de n-acetilcisteína – NAC), C-NAC100 (MCT + 100mg/kg NAC) e C-NAC300 (MCT + 300mg/kg NAC); Gráfico em menor destaque – Eixo X: S (sem indução MCT- Salina); S-NAC10 (Salina +10mg/kg NAC), S-NAC100 (Salina +100mg/kg NAC) e S-NAC300 (Salina + 300mg/kg NAC); (n= 5-7; N= 43).

* Significativamente diferente quando comparado ao grupo C-PLAC ($P \leq 0,05$).

Significativamente diferente quando comparado ao grupo C-NAC10 ($P \leq 0,05$).

4.2.3.2 Creatinofosfoquinase Isoenzima Muscular Cardíaca (CK-MB)

Para o marcador CK-MB, verificou que valores mais elevados foram obtidos para os animais do grupo C-PLAC, quando comparado aos animais do grupo C-NAC100, sendo este resultado significativamente estatístico ANOVA ($p \leq 0,05$) (figura 13). O mesmo acontece entre os grupos C-NAC10 versus C-NAC100. Os valores de média \pm erro padrão estão ilustrados na tabela 7.

Não foi encontrado na literatura consultada, médias para a isoenzima CK-MB na espécie por nós adotada. Por este motivo, a média utilizada como parâmetros de

normalidade será do nosso grupo controle, por considerarmos animais em condições de saúde adequada do ponto de vista clínico ($537,30 \pm 19,68$).

O miocárdio contém expressivas quantidades de CK-MB, que é uma isoforma da CK, e sua liberação para o meio extracelular ocorre mediante situações de necrose do miocárdio. Em humanos, a elevação plasmática da CK-MB (igual ou maior que 6% da CK total), é o indicador mais específico de isquemia miocárdica. (KANEKO, 2008). Portanto, sua mensuração representa um recurso importante para a detecção de lesão cardíaca (DINIZ *et. al*, 2007).

Em humanos, a dosagem da CK-MB vem sendo utilizada como principal método para confirmação ou exclusão de infarto agudo do miocárdio, e picos de CK-MB podem prever eventos cardíacos desfavoráveis em populações de alto risco. Porém, CK e CK-MB são pobres marcadores de danos no miocárdio em cães, sendo a CK-MB um marcador cardíaco menos específico que a troponina cardíaca para esta espécie (LOPES *et al.*, 2005; DINIZ *et al.*, 2007). No entanto, Ye *et al.* (2001), induziram experimentalmente hipertrofia ventricular esquerda em cães resultando em uma redução de 50% nos níveis de CK-MM e um aumento de dez vezes na CK-MB. Em medicina veterinária, a CK-MB tem sido utilizada para avaliar a cardiotoxicidade de fármacos em protocolos quimioterápicos e de peçonhas em intoxicações experimentais (CAMPLESI, 2009).

O padrão de distribuição das isoenzimas varia entre os órgãos das diferentes espécies. Desta forma, a identificação das isoenzimas pode ser utilizada para ajudar a determinar a origem do tecido, cuja elevação de CK está presente (BULCKE, SHERWIN, 1969). Estudos Ontogênicos em ratos revelaram que todos os órgãos investigados continham apenas o CK-BB em estágios iniciais de desenvolvimento fetal. No músculo esquelético, formas CK-BB desaparecem lentamente e são substituídas inicialmente por isoformas CK-MB seguido de CK-MM. Misturas de isoenzimas ocorrem durante a transição. No padrão de adulto, isoformas CK-MB foram diversas vezes citadas por estarem presentes ou não no músculo esquelético. A inconsistência dos dados em relação à presença da CK-MB em músculo esquelético desses animais pode ser devido à origem do músculo esquelético analisado. Isso porque nem todo músculo esquelético pode conter isoenzima CK-MB (THORSTENSSON *et al.*, 1976). Contudo, outros estudos indicam que, embora existam mais CK-MM no músculo branco do que vermelho do rato, não há qualquer fração CK-MB neles (DAWSON, FINE, 1967).

As razões para as diferenças na detecção de CK-MB em músculo esquelético de mamíferos não são evidentes. O padrão adulto desta isoenzima em músculos esqueléticos de rato aparece noventa dias após o nascimento, enquanto que no músculo cardíaco, a mudança ocorre mais cedo e o padrão adulto tem tanto CK-MB e CK-MM (EPPENBERGER et al., 1967).

Segundo Yan e Huxtable (1996), o estabelecimento de *Cp* por MCT promove um quadro de hipóxia e EO gerando inflamação e morte celular, não só das células musculares cardíacas, mas de outros órgãos envolvidos como fígado, rim, músculo esquelético, pulmão e sistema nervoso. Em nosso estudo, assim como para CK, os níveis séricos da CK-MB foram mais elevados no grupo C-PLAC quando comparado ao grupo A, porém não foi o suficiente para gerar um resultado estatisticamente significativo. Portanto, a MCT apesar de estabelecer um quadro de hipertrofia de VD e IC, não foi capaz de gerar danos cardíacos importantes no período experimental de trinta e cinco dias. É possível que em períodos maiores de indução, resultados diferentes possam ser obtidos. Outro ponto a ser considerado é a meia-vida desta enzima no sangue, que é muito curta em todas as espécies, podendo gerar resultados falsos negativos. E por fim deve considerar também o padrão de distribuição desta isoenzima. Segundo Santos (2005), o padrão de distribuição da CK-MB é diferente entre algumas espécies, sendo observada maior concentração desta isoenzima no ventrículo esquerdo dos humanos, enquanto em cães esta concentração é maior no ventrículo direito. Em ratos, não encontrou na literatura consultada, informações sobre este assunto. Entretanto, não pode negligenciar o fato do VD de ratos não apresentar níveis satisfatórios desta isoenzima. Maiores estudos a respeito deste marcador são necessários para uma discussão mais consistente.

Uma vez administrado a NAC, observou que as médias para esta isoenzima sofreram redução importante, com resultados estatisticamente significativos na dose de 100mg/kg (tabela 7), quando comparado aos grupos C-PLAC e C-NAC10, ficando abaixo das médias do grupo A. É possível que a ação antioxidante da NAC explique tais resultados, uma vez que o estabelecimento do *Cp* eleva os níveis de oxidantes em diversos órgãos, inclusive no coração (FEOLI et al., 2006). A NAC atua favorecendo a biossíntese de GSH, uma vez que sofre desacetilação no interior da célula liberando cisteína, um aminoácido essencial para a síntese desse importante tripeptídeo que ajuda na manutenção do equilíbrio redox celular (SIQUEIRA, 2011).

De qualquer forma, uma vez mensurada, é importante considerar os valores de CK-MB em relação à CK total para se determinar se está realmente aumentada. Pois valores aumentados de CK-MB acompanhados de aumento de CK total podem ser resultantes de esforço físico e/ou danos musculares. Porém, quando se observa aumento de CK-MB não acompanhado de aumento de CK total, a porcentagem dessa isoenzima fica elevada, comprovando-se lesão no músculo cardíaco (MELO *et al.*, 2008). Em nosso estudo, os níveis séricos de CK e CK-MB obedeceram ao mesmo padrão, não sugerindo danos musculares importantes e/ou níveis insatisfatórios desta isoenzima no tecido avaliado, neste caso, ventrículo direito.

Não foi observado em nosso estudo, resultado significativo entre os grupos A e S (placebo, 10, 100 e 300mg/kg) para a isoenzima CK-MB (figura 13).

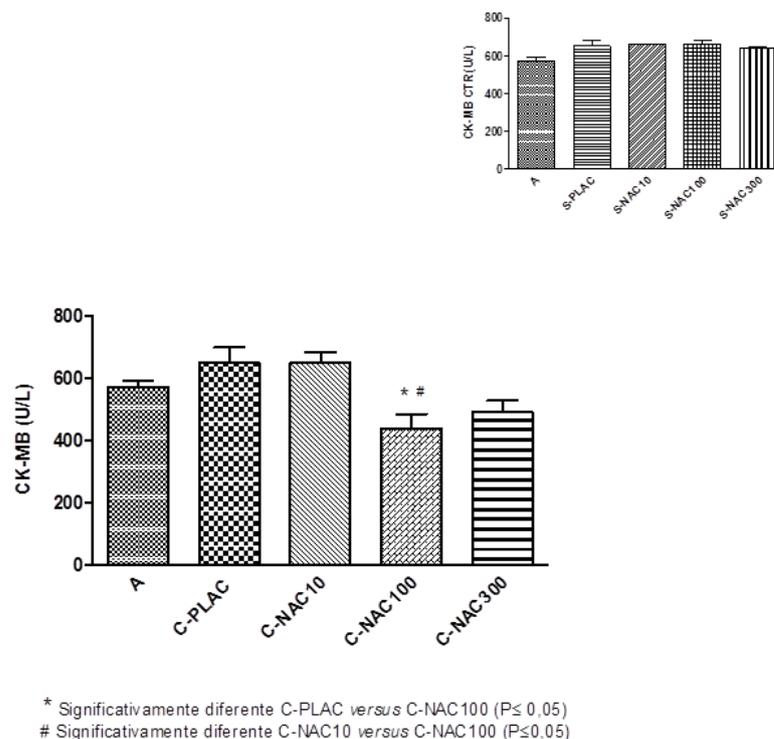


Figura 13. Níveis séricos de CK-MB (U/L) em ratos induzidos com MCT *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em condições laboratoriais. Valores expressos em média (\pm erro padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5%. Gráfico em maior destaque - Eixo Y: concentrações séricas CK-MB (creatinofosfoquinase fração cardíaca); Eixo X: A (controle absoluto = SHAM), C (com indução de monocrotalina - MCT); PLAC (placebo - veículo composto por água e sorbato de potássio), C-NAC10 (MCT + 10mg/kg de n-acetilcisteína - NAC), C-NAC100 (MCT + 100mg/kg NAC) e C-NAC300 (MCT + 300mg/kg NAC); Gráfico em menor destaque - Eixo X: S (sem indução MCT- Salina); S-NAC10 (Salina +10mg/kg NAC), S-NAC100 (Salina +100mg/kg NAC) e S-NAC300 (Salina + 300mg/kg NAC); (n= 5-7; N= 43).

* Significativamente diferente quando comparado ao grupo MCT ($P \leq 0,05$).

Significativamente diferente quando comparado ao grupo MCT + 10mg ($P \leq 0,05$).

4.2.4 Lipoperoxidação (LPO)

Analisando os dados para TBARS no tecido cardíaco, especificamente no ventrículo direito, verificou que níveis mais elevados foram obtidos para os animais do grupo C-PLAC, quando comparado aos animais do grupo A, sendo este resultado significativamente estatístico ANOVA ($p \leq 0,05$) (figura 14). Os valores de média \pm erro padrão estão ilustrados na tabela 8.

Na situação experimental apresentada em nosso estudo, o aumento dos níveis de LPO no grupo C-PLAC justifica-se pelo fato da MCT reproduzir em nosso modelo experimental, um quadro de HAP e conseqüente estabelecimento de ICD. Embora a etiologia da IC não esteja completamente elucidada, inúmeros estudos sugerem a participação de oxidantes, principalmente o aumento das ERO na patogênese desta doença (BOGAARD et al., 2009). A administração da MCT produz um aumento dos lipoperóxidos devido à sua metabolização hepática, que conduz a uma redução da GSH e também de citocromo P-450. Isto leva a produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, gerando radical hidroxil que atacam os lipídios das membranas produzindo dano celular (HUBSCHER, 2005). Este processo pode ser desencadeado diretamente por estas espécies, induzindo lesão celular direta ou ser conseqüência da ativação do processo inflamatório, mediado por fatores quimiotáticos, fatores de crescimento, enzimas proteolíticas e fatores de transcrição (VALLYATHAN; SHI, 1997). Neste contexto, as ERO são a principal causa de dano celular e tecidual, incluindo a apoptose, associada com várias doenças inflamatórias crônicas (RAHMAN; MACNEE, 2000).

O EO é o resultado da redução de defesas antioxidantes, ou um aumento na produção de oxidantes, pela exposição a concentrações excessivas de oxigênio ou agentes intoxicantes (SILVA, 2008). Logo, de acordo com os resultados obtidos em nossas análises, podemos sugerir que uma situação de EO foi instalada em nosso modelo experimental.

As doses de NAC (10, 100 e 300), testadas experimentalmente neste estudo, não foram capazes de gerar resultados estatisticamente significativos ANOVA ($p \leq 0,05$) no período experimental de 35 dias (tabela 8). Contudo, foi observada, uma tendência progressiva na redução desses valores, sendo os grupos C-NAC100 e C-NAC300, os que apresentaram resultado mais próximo ao do grupo A, sugerindo doses mais eficientes. É possível que a ação antioxidante da NAC explique tais

resultados, uma vez que ela atua favorecendo não só a biossíntese de GSH ajudando na manutenção do equilíbrio redox celular (SIQUEIRA, 2011), mas também como *scavengers* de H₂O₂, ácido hipocloroso e do radical hidroxil, inibindo a liberação de TNF α , ativação de citocinas pró-inflamatórias e apoptose (RITTER, 2007). Outro ponto a ser considerado é o tempo e a frequência de administração da NAC. Segundo Kelly (1998), após 12h da administração oral deste medicamento, níveis irrisórios da droga são observados no plasma, sendo recomendadas administrações a cada 8 a 12h. É possível que este fato tenha influenciado em nossos resultados, uma vez que optamos pela administração da droga a cada 24h. Acreditamos que períodos mais prolongados de terapia associados a administrações mais frequentes, possam revelar resultados mais promissores e diferentes dos obtidos por nós.

Não foi observado em nosso estudo, resultado estatisticamente significativo entre os grupos A e S (placebo, 10, 100 e 300) para a variável TBARS.

Tabela 8. Comparação entre médias (\pm Erro Padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5% ($P \leq 0,05$) para as variáveis bioquímicas teciduais (ventrículo direito) de ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em condições laboratoriais (n= 5-7; N= 43). LABCOM/IB/UFRJ, 2013.

| Grupos | A | | | C | | | S* | | |
|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | CONT | PLAC | NAC 10mg | NAC 100mg | NAC 300mg | PLAC | NAC 10mg | NAC 100mg | NAC 300mg |
| TBARS (nMol/mg/ptn) | 0,97 ^b (0,14) | 4,1 ^a (1,36) | 2,45 ^{ab} (0,34) | 1,27 ^{ab} (0,33) | 1,55 ^{ab} (0,09) | 0,82 (0,04) | 0,90 (0,11) | 1,07 (0,09) | 1,12 (0,06) |
| SOD (U/mg/ptn) | 0,15 ^b (0,01) | 0,28 ^{ac} (0,03) | 0,30 ^a (0,01) | 0,20 ^{bc} (0,01) | 0,20 ^{bc} (0,01) | 0,20 (0,01) | 0,20 (0,01) | 0,22 (0,02) | 0,18 (0,01) |
| CAT (U/mg/ptn) | 1,47 ^{ab} (0,29) | 2,16 ^a (0,32) | 0,65 ^{bc} (0,19) | 0,06 ^c (0,03) | 1,37 ^{ab} (0,30) | 1,47 (0,58) | 1,96 (0,31) | 2,56 (0,09) | 2,36 (0,52) |

Legenda: A = controle absoluto; S = animais sem indução com monocrotalina (MCT); C = animais com indução com MCT; CONT = controle; PLAC = placebo (solução de sorbato de potássio); NAC 10mg, 100mg e 300mg = N-acetilcisteína 10mg/kg, 100mg/kg e 300mg/kg; TBARS = substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nMol/mg ptn = número de molaridade por miligrama de proteína); SOD = superóxido dismutase (U/mg ptn = unidade de SOD por mg de proteína); CAT = catalase (U/mg ptn = unidade de CAT por mg de proteína). Médias seguidas pela mesma letra (grupo A *versus* grupos C) não diferem entre si, segundo o teste de Bonferroni's ($P \leq 0,05$).

* Médias não diferem entre si (grupo A *versus* grupos S) segundo o teste de Bonferroni's ($P \leq 0,05$).

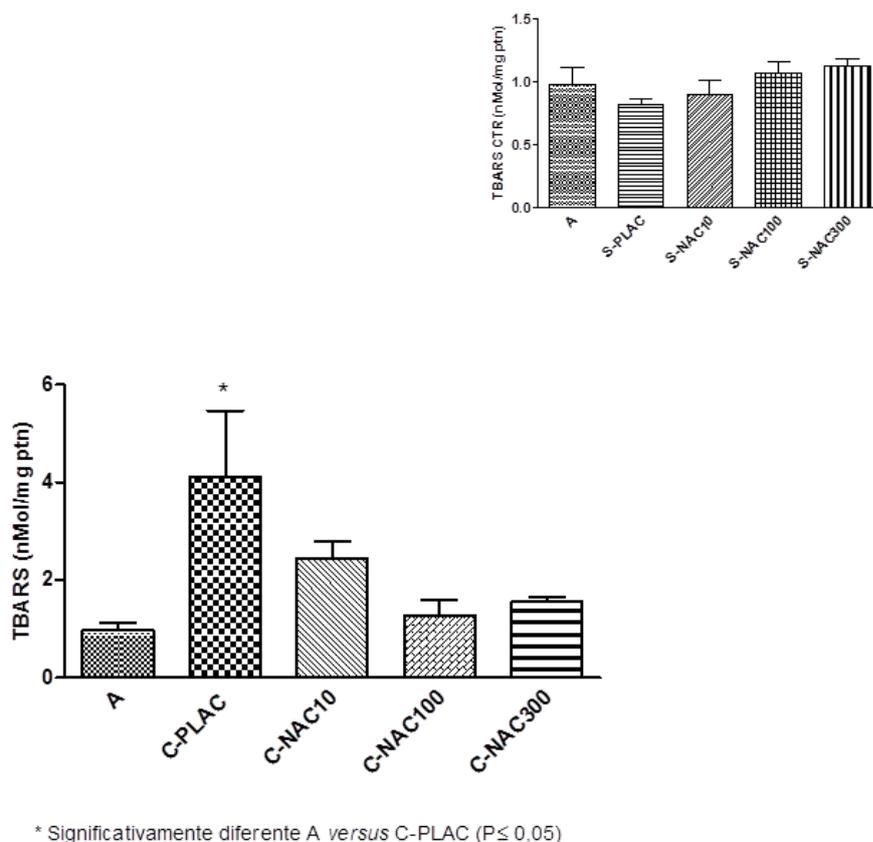


Figura 14. Níveis teciduais de TBARS (nMol/mg ptn) em ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em condições laboratoriais. Valores expressos em média (\pm erro padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5%. Gráfico em maior destaque - Eixo Y: concentrações teciduais TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico); Eixo X: A (controle absoluto = SHAM), C (com indução de monocrotalina - MCT); PLAC (placebo – veículo composto por água e sorbato de potássio), C-NAC10 (MCT + 10mg/kg de n-acetilcisteína – NAC), C-NAC100 (MCT + 100mg/kg NAC) e C-NAC300 (MCT + 300mg/kg NAC); Gráfico em menor destaque – Eixo X: S (sem indução MCT- Salina); S-NAC10 (Salina +10mg/kg NAC), S-NAC100 (Salina +100mg/kg NAC) e S-NAC300 (Salina + 300mg/kg NAC); (n= 5-7; N= 43).
* Significativamente diferente quando comparado ao grupo C-PLAC ($P \leq 0,05$).

4.2.5 Enzimas Antioxidantes

4.2.5.1 Superóxido Dismutase (SOD)

Para a atividade da enzima antioxidante SOD, especificamente no ventrículo direito, verificou que níveis mais elevados foram obtidos para os animais do grupo C-PLAC, quando comparado aos animais do grupo A, sendo este resultado significativamente estatístico ANOVA ($p \leq 0,05$) (figura 15). O mesmo acontece entre os grupos C-NAC10 *versus* A, C-NAC10 *versus* C-NAC100 e C-NAC10 *versus* C-NAC300. Os valores de média \pm erro padrão estão ilustrados na tabela 8.

Em nosso estudo, o aumento da atividade da SOD no grupo C-PLAC justifica-se pelo fato da MCT reproduzir em nosso modelo experimental, um quadro de HAP e conseqüente estabelecimento de ICD. A SOD é considerada a mais importante enzima antioxidante, e atua como primeira linha de defesa contra oxidantes, especialmente ânion superóxido, que é altamente reativo e pode causar danos teciduais, devido à proliferação e à apoptose de células endoteliais (PANDEY et al., 2000). O radical superóxido tem sido diretamente relacionado com alteração do tônus vascular arterial e aumento da resistência vascular pulmonar (RHOADES et al., 1990), bem como mediador de injúria endotelial e vasoconstrição da artéria pulmonar. Portanto, uma maior atividade da SOD em tecido cardíaco (VD) no grupo C-PLAC sugere que concentrações mais elevadas do ânion superóxido estejam presentes. Csiszar et al. (2009) e Silva et al. (2011) em estudo semelhante, observaram que vinte e um dias após injeção de MCT em ratos, ocorre um aumento na concentração de radical superóxido, indo de encontro às nossas suspeitas.

Outra consideração a ser feita é com relação aos níveis de superóxido e do NO nos quadros de HAP. Ludke et al. (2010) em estudo na mesma linha experimental, citaram uma expressão reduzida do lúmen arteriolar pulmonar após vinte e um dias da injeção com MCT, estando associada à redução da expressão proteica da eNOS em homogeneizado de pulmão, e da expressão de NADPH diaforase na parede das arteríolas pulmonares. Esta última enzima é considerada um marcador da produção de NO (VALTSCHANOFF et al., 1992), o que sugere, que esta espécie encontra-se reduzida neste modelo de HAP. Por sua vez, a HAP tem sido associada com disfunção endotelial e EO (CSISZAR et al., 2009). Desta forma, um aumento na produção de oxidantes, como o radical superóxido, pode estar contribuindo ainda, para a redução da biodisponibilidade de NO nos tecidos, pulmonares e cardíacos.

Estudos indicam que, no estado de hipertrofia cardíaca, a atividade das enzimas antioxidantes inicialmente tem se apresentado elevada, e com o avançar do quadro da doença, as mesmas mostraram-se reduzidas, associadas ao aumento do EO. Hill e Singal (1996) e Ecarnot-Lambriet et al. (2003), em modelo de hipertrofia cardíaca, subsequente a infarto em ratos, mostraram que durante a fase de hipertrofia cardíaca ocorreu aumento na atividade da SOD. Porém, no estado de dilatação cardíaca e/ou ICD, esta enzima encontrava-se levemente reduzida. Hubscher (2005) em estudo semelhante descreveu uma redução de 82% na

atividade da SOD, justificando este fato, pelo provável aumento do ânion superóxido nos homogeneizados de coração de rato tratados com MCT no período de vinte e um dias. Farahmand et al. (2004) nesta mesma linha de pesquisa, determinaram após duas semanas de tratamento com MCT, um aumento de 20% na atividade da SOD. Com seis semanas de tratamento, este mesmo estudo, demonstrou uma redução de 15% na atividade da SOD. Estes resultados mostram como o tratamento com MCT altera a atividade das enzimas antioxidantes em função do tempo. Em nosso trabalho, não fizemos uma comparação temporal, sendo utilizado somente o momento cinco semanas após tratamento com MCT, onde observamos um aumento significativo na atividade da SOD quando comparado ao grupo A. Fato que sugere a presença de elevadas concentrações do ânion superóxido. É possível, com base nos relatos acima, que em estágios anteriores (três semanas), a atividade da SOD pudesse estar ainda mais elevada (fase de hipertrofia cardíaca). A partir deste período, fase de transição entre hipertrofia e ICD, diversos trabalhos sugerem uma redução na atividade da SOD, apontando uma perda quanto à proteção antioxidante enzimática (HUBSCHER, 2005).

Em nosso estudo verificamos que os resultados do grupo C-NAC10 foram estatisticamente significativos (ANOVA $p \leq 0,05$), quando comparado ao grupo A (tabela 8). Sugerindo que a dose de 10mg/kg de peso de NAC não foi suficiente para induzir uma boa resposta antioxidante. Este fato isolado não é o suficiente para afirmar um insucesso da dose, uma vez que a frequência da administração obedeceu ao padrão de 24h de intervalo, sendo sugerido por Kelly (1998), um intervalo insatisfatório, onde níveis irrisórios desta droga são observados no plasma.

Nossos resultados revelaram ainda, uma redução significativa (ANOVA $p \leq 0,05$) nos níveis da atividade de SOD nos grupos C-NAC100 e C-NAC300 quando comparados ao grupo C-NAC10 (Figura 15).

A NAC é considerada uma pró- droga de cisteína (ZAFARULLAH et al., 2003). Segundo Kelly (1998), ela é uma excelente fonte de grupamento sulfidril, que no organismo é convertido a metabólitos que estimulam a biossíntese de GSH. No interior da célula, a NAC sofre desacetilação liberando cisteína, um aminoácido essencial para a síntese desse importante tripeptídeo (GSH), ajudando nos processos de desintoxicação e na manutenção do equilíbrio redox celular. A GSH tem a capacidade de se conjugar com a DHA, composto ativo oriundo do

metabolismo da MCT, formando um metabólito pirrólico, a dihidroterocinidina (GSH-DHP), que é solúvel em água e mais estável que a DHA (WANG et al., 2005).

Além disto, a NAC é um *scavenger* de H_2O_2 , do ácido hipoclorídico e do radical hidroxil, e por este motivo, inibe a liberação de $TNF\alpha$, a ativação de citocinas pró-inflamatórias e apoptose celular (RITTER, 2007). O H_2O_2 diretamente ou indiretamente através de sua redução a radical hidroxil, via reação de Fenton, atua como mensageiro na síntese e ativação de mediadores inflamatórios. Logo, a NAC atuando como *scavenger* destes radicais, acaba inibindo a liberação dos mesmos. Por estas razões, o papel antioxidante da NAC é reconhecido (RITTER, 2007). De acordo com essas citações, pode sugerir que os efeitos benéficos da NAC como droga antioxidante tenham influenciado nossos resultados, e que concentrações mais baixas tanto do ânion superóxido como do H_2O_2 estejam presentes, sendo as doses de 100 e 300mg/kg eficientes na terapia do *Cor pulmonale* induzido por MCT.

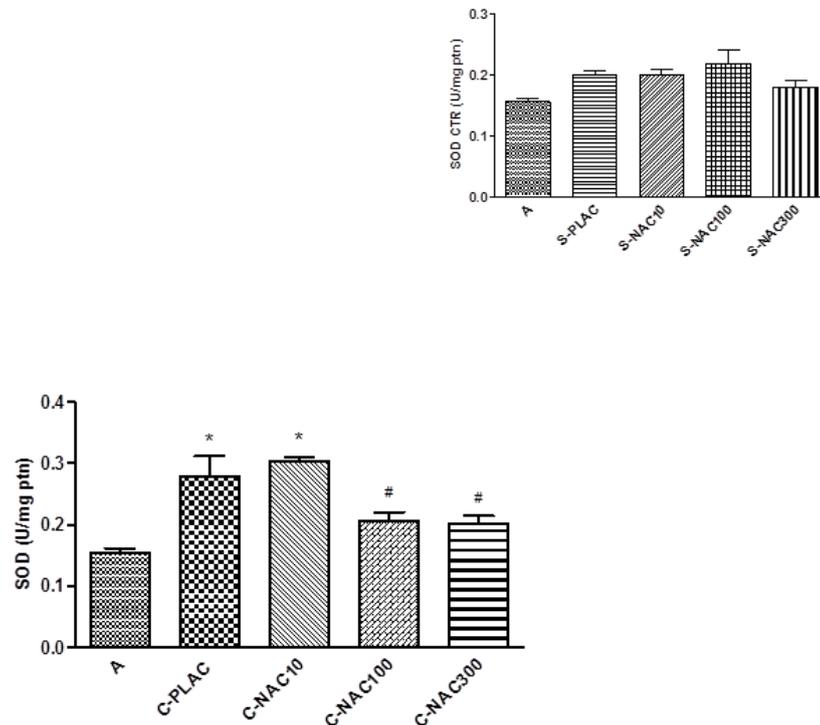
Outra consideração a ser feita, e que talvez ajude a entender melhor nossos resultados com relação aos grupos tratados com NAC, é que estes grupos iniciaram a terapia com vinte e um dias de indução com MCT, ou seja, período de hipertrofia cardíaca. Nesta fase, acredita-se que os níveis da atividade de SOD estejam mais elevados, havendo um sinergismo com a NAC no processo de defesa antioxidante, que além de favorecer a biossíntese de GSH também atua como *scavengers* de H_2O_2 . Entretanto, quando comparou estes grupos ao grupo C-PLAC, que não recebeu qualquer terapia antioxidante e permaneceu induzido com MCT por cinco semanas, os resultados apesar de significativamente estatísticos podem estar subestimados. Neste caso, o grupo C-PLAC já havia sofrido a transição da fase de hipertrofia para ICD, e teoricamente com níveis mais reduzidos na atividade de SOD.

Vale ressaltar ainda, que parte da redução da atividade da SOD nos grupos C-NAC100 e C-NAC300, pode estar relacionada com uma redução espontânea, observado a partir da terceira semana de indução (fase de evolução para ICD), onde os níveis da atividade desta enzima diminuem, sugerindo um aumento nos níveis do ânion superóxido (HUBSCHER, 2005).

Segundo Nelson et al. (2006) e Ritter (2007), apesar da SOD ser uma importante linha de defesa contra as ERO, sua elevada atividade encontra-se envolvida com o aumento do EO em inúmeros modelos experimentais, provavelmente por produzir H_2O_2 além da capacidade de degradação da célula. Em

nosso estudo, este fato não foi evidenciado, provavelmente pela ação da NAC como *scavengers* de H_2O_2 , havendo uma ação sinérgica ente a SOD e NAC.

Não foi observado em nosso estudo, resultado estatisticamente significativo entre os grupos A e S (placebo, 10, 100 e 300) para a variável SOD.



* Significativamente diferente A versus C-PLAC e C-NAC10 ($P \leq 0,05$)
 # Significativamente diferente C-NAC10 versus C-NAC100 e C-NAC300 ($P \leq 0,05$)

Figura 15. Níveis teciduais de atividade da SOD (U/mg ptn) em ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em condições laboratoriais. Valores expressos em média (\pm erro padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5%. Gráfico em maior destaque - Eixo Y: concentrações teciduais de atividade da SOD (superóxido dismutase); Eixo X: A (controle absoluto = SHAM), C (com indução de monocrotalina - MCT); PLAC (placebo – veículo composto por água e sorbato de potássio), C-NAC10 (MCT + 10mg/kg de n-acetilcisteína – NAC), C-NAC100 (MCT + 100mg/kg NAC) e C-NAC300 (MCT + 300mg/kg NAC); Gráfico em menor destaque – Eixo X: S (sem indução MCT- Salina); S-NAC10 (Salina +10mg/kg NAC), S-NAC100 (Salina +100mg/kg NAC) e S-NAC300 (Salina + 300mg/kg NAC); (n= 5-7; N= 43)

* Significativamente diferente quando comparado ao grupo C-PLAC ($P \leq 0,05$).

Significativamente diferente quando comparado ao grupo C-NAC10 ($P \leq 0,05$).

4.2.5.2 Catalase (CAT)

Para a atividade da enzima antioxidante CAT, especificamente no ventrículo direito, verificou que níveis mais elevados foram obtidos para os animais do grupo C-PLAC, quando comparado aos animais do grupo C-NAC10 e C-NAC100, sendo este resultado significativamente estatístico ANOVA ($p \leq 0,05$) (figura 16). O mesmo

acontece entre os grupos A *versus* C-NAC100, e C-NAC100 *versus* C-NAC 300. Os valores de média \pm erro padrão estão ilustrados na tabela 8.

A CAT é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 molecular, sendo sua atividade dependente de NADPH (FERREIRA, MATSUBARA, 1997). Com base em sua atividade catalítica, deve considerar que apesar de ter induzido um ambiente de EO, talvez o peróxido de hidrogênio não seja a principal ERO envolvida na toxicidade da MCT. E por este motivo, quando comparou os grupos A *versus* C-PLAC, não encontrou valores estatisticamente significativos (ANOVA $p \leq 0,05$) (figura 16). Resultados semelhantes foram obtidos por Hubscher (2005). Outra possibilidade seria segundo as citações de Kono e Fridovich (1982), onde afirmam que a CAT pode ser inibida pela presença de altas concentrações de O_2 . Entretanto, esta reação pode ser evitada e/ou revertida pela ação da SOD, que foi estatisticamente superior quando comparada ao grupo A.

Alguns estudos têm se referido a alterações na atividade das enzimas antioxidantes em resposta ao EO nas doenças cardiovasculares. Na fase de hipertrofia, essas enzimas tendem a aumentar sua atividade, e com o avançar do quadro, na fase de IC, essa atividade tende a decrescer (HUBSCHER, 2005). Pichardo et al. (1999) e Ecarnot-Laubriet et al. (2003) em estudo semelhante, observaram que a atividade da CAT não sofre alterações na fase de hipertrofia cardíaca, porém na fase de IC, essa atividade se eleva. Já Hill e Singal (1996) em modelo de hipertrofia cardíaca em ratos, mostraram que durante a fase de hipertrofia cardíaca esta enzima não sofre alteração. Mas, no estado de IC, a CAT sofre progressiva redução. Farahmand et (2004) em estudos com ratos induzidos com MCT, observaram que com duas semanas de tratamento a atividade da CAT aumentou, e após seis semanas essa atividade diminuiu em relação ao grupo controle. Nossos resultados embora não sejam estatisticamente significativos, assemelham-se aos obtidos por Pichardo et al. (1999) e Ecarnot-Laubriet et al. (2003). Apesar de não ter realizado uma análise temporal comparativa, nossa análise para o grupo C-PLAC foi obtida com cinco semanas de indução por MCT, ou seja, fase de IC, sendo observada uma elevação na atividade da CAT em relação ao grupo A (figura 16). Esse aumento pode estar relacionado com uma maior oferta de H_2O_2 , especialmente os oriundos da elevada atividade da SOD neste grupo, e ainda, com uma redução na expressão da proteína eNOS (RITTER 2007; SILVA, 2011). É

possível que durante a fase de hipertrofia cardíaca, resultados diferenciados fossem obtidos.

Deve considerar ainda, que a CAT apesar de estar presente no citosol, ela se encontra em maior quantidade nos peroxissomas, principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, que não está presente no coração (ANDREAZZA et al., 2004). Neste órgão, a CAT está presente apenas nas mitocôndrias (VASCONCELOS et al., 2007). Logo, o coração fica mais exposto aos danos provocados pela produção de oxidantes (ANDREAZZA et al., 2004). Acredita que a baixa presença de CAT no material por nós avaliado, homogeneizado de ventrículo direito, possa de alguma forma ter influenciado nossos resultados, mesmo diante uma situação de EO provocado pela indução com MCT.

Em nosso estudo, os grupos C-NAC10 e C-NAC100 apresentaram valores significativamente estatísticos quando comparados ao grupo C-PLAC ANOVA ($p \leq 0,05$) (tabela 8). Acredita que esses resultados sejam decorrentes principalmente, da ação antioxidante da NAC atuando como *scavengers* de H_2O_2 , e inibindo a ativação de mediadores inflamatórios (RITTER, 2007). E ainda, pelo fato da NAC atuar sinergicamente à ação da SOD, reduzindo a oferta de H_2O_2 oriundo do processo de dismutação do ânion superóxido.

Outro resultado interessante foi observado entre os grupos C-NAC100 *versus* C-NAC300. Neste caso, tem uma relação inversa entre dose e atividade da CAT, permitindo a formação de uma curva em “U” (figura 16). Acredita que este fato possa estar relacionado com a cinética enzimática, ou ainda com o nível de saturação da atividade desta enzima em seu sítio de ação. Embora não tenha encontrado dados disponíveis na literatura consultada que respaldem esses comentários, sugere que maiores estudos a respeito do tema sejam propostos.

Não foi observado em nosso estudo, resultado estatisticamente significativo entre os grupos A e S (placebo, 10, 100 e 300) para a variável CAT. Entretanto, foi observado nos grupos tratados uma tendência crescente nos níveis de atividade da CAT, com resultados superiores aos encontrados no grupo A e S-PLAC (Figura 16). Tal fato pode estar relacionado com os comentários feitos por Kleinveld et al. (1992), que lembram que a NAC por ser uma droga com potencial pró-oxidante, não é recomendada na ausência de situações de EO. E talvez por este motivo, além dos efeitos antioxidantes, observa na ausência do mesmo, efeitos pró-oxidativos.

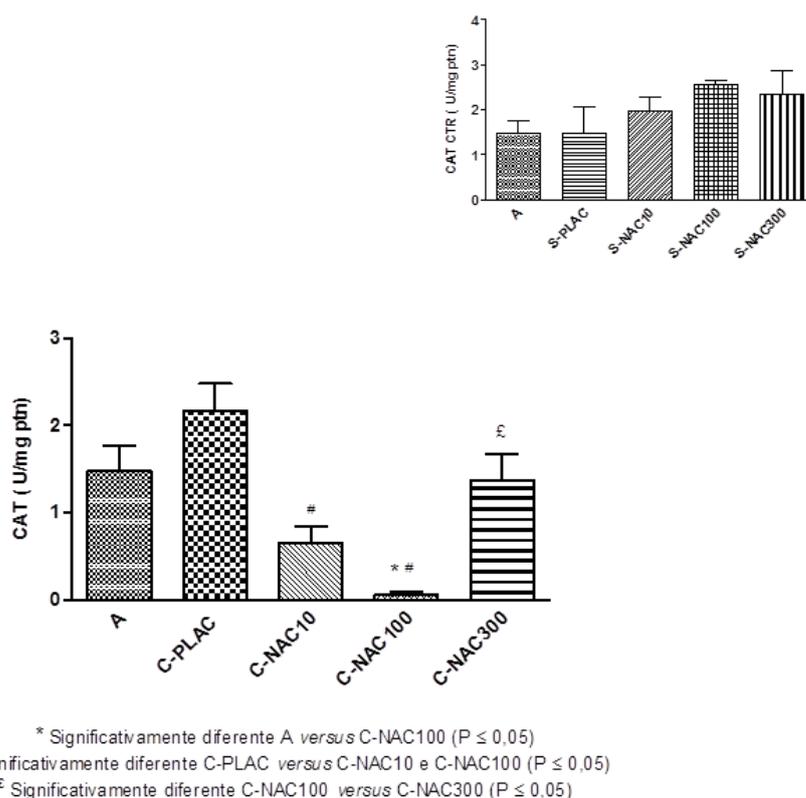


Figura 16. Níveis teciduais de atividade da CAT (U/mg ptn) em ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em condições laboratoriais. Valores expressos em média (\pm erro padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5%. Gráfico em maior destaque - Eixo Y: concentrações teciduais de atividade da CAT (superóxido dismutase); Eixo X: A (controle absoluto = SHAM), C (com indução de monocrotalina - MCT); PLAC (placebo – veículo composto por água e sorbato de potássio), C-NAC10 (MCT + 10mg/kg de n-acetilcisteína – NAC), C-NAC100 (MCT + 100mg/kg NAC) e C-NAC300 (MCT + 300mg/kg NAC); Gráfico em menor destaque – Eixo X: S (sem indução MCT- Salina); S-NAC10 (Salina +10mg/kg NAC), S-NAC100 (Salina +100mg/kg NAC) e S-NAC300 (Salina + 300mg/kg NAC); (n= 5-7; N= 43)

* Significativamente diferente quando comparado ao grupo A ($P \leq 0,05$).

Significativamente diferente quando comparado ao grupo C-PLAC ($P \leq 0,05$).

£ Significativamente diferente quando comparado ao grupo C-NAC100 ($P \leq 0,05$).

4.3 – Análises Morfológicas e Morfométricas

Dentre os achados necroscópicos observados nos grupos C destacam-se os compatíveis com o quadro de ICD, como a presença de efusão pleural, ascite, dilatação atrial direita, hipertrofia e dilatação ventricular direita, padrão lobular evidente hepático e edema subcutâneo periférico (prancha 1, figuras A, B e C). Nossos resultados justificam-se pelo fato da MCT ao cair na circulação, causar proliferação celular nas arteríolas pulmonares, impedância ao fluxo sanguíneo com consequente HAP. Este quadro evolui para hipertrofia compensatória do VD e

progressivo desenvolvimento de ICD (SILVA, 2011). Resultados semelhantes aos nossos, foram também observados por Barreto (2013), em estudo com IC.



Prancha 1: Macroscopia em ratos. A. Quantidade moderada de líquido em cavidade torácica (hidrotórax - seta). B. Edema subcutâneo discreto em região inguinal (seta). C. Dilatação atrial (seta preta) e ventricular (seta branca) direitas. Arquivo pessoal, Setor de Morfologia/UENF, 2013.

4.3.1 Histopatologia Hepática

Em nosso estudo as principais lesões histopatológicas encontradas no fígado de ratos induzidos com MCT foram: degeneração hidrópica (42,0%), megacariose (20,0%), hemorragia (16%) e congestão (14%). Outras lesões também foram identificadas, porém com menor frequência como hiperplasia de ducto biliar, telangectasia e necrose (tabela 9).

Tabela 9. Lesões histopatológicas hepáticas em ratos Wistar portadores de *Cor pulmonale* induzidos por MCT, sobre efeito de N-acetilcisteína (NAC) no período experimental. Setor de Morfologia/UENF, 2013.

| Lesões | | Concentrações de NAC | | | | | | | | | | | | | | | | Total |
|--------------------|-----|----------------------|----|------|----|----|----|-----|----|-----|-----|-------|----|----|----|----|----|-------|
| | | Controle | | PLAC | | 10 | | 100 | | 300 | | Total | | | | | | |
| | | A | C | S | C | S | C | S | C | S | C | S | C | | | | | |
| | | Fa | Fr | Fa | Fr | Fa | Fr | Fa | Fr | Fa | Fr | Fa | Fr | Fa | Fr | Fa | Fr | |
| de menor gravidade | DHL | 3 | 60 | 2 | 29 | 1 | 20 | 1 | 17 | 5 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 |
| | DHM | 0 | 0 | 1 | 14 | 4 | 80 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 40 | 2 | 40 | 9 | |
| | MGC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 67 | 0 | 0 | 3 | 60 | 0 | 0 | 3 | 60 | 10 |
| | HDB | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | TLG | 0 | 0 | 1 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | CHL | 0 | 0 | 2 | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| | CHM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| Subtotal | | 3 | - | 6 | - | 5 | - | 7 | - | 5 | - | 7 | - | 2 | - | 6 | - | 41 |
| de maior gravidade | HHF | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | HHM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | HHD | 0 | 0 | 2 | 29 | 0 | 0 | 2 | 33 | 0 | 0 | 1 | 20 | 0 | 0 | 1 | 20 | 6 |
| | NHM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Subtotal | | 0 | - | 2 | - | 0 | - | 4 | - | 0 | - | 2 | - | 0 | - | 1 | - | 9 |
| Total | | 3 | - | 8 | - | 5 | - | 11 | - | 5 | - | 9 | - | 2 | - | 7 | - | 50 |

Legenda: (PLAC) placebo; (A) controle absoluto; (S) sem e (C) com indução experimental de *Cor pulmonale* com monocrotalina; (Fa) Frequência absoluta e (Fr) relativa; (DHL) degeneração hidrópica leve e (DHM) moderada; (MGC) megacariose; (HDB) hiperplasia ducto biliar; (TLG) telangectasia; (CHL) congestão hepática leve, (CHM) moderada; (HHF) hemorragia hepática focal, (HHM) multifocal e (HHD) difusa; (NHM) necrose hepática multifocal; (n= 5-7; N= 43).

A lesão hepática mais frequente em nosso estudo foi a degeneração hidrópica (DG), estando presente em praticamente todos os grupos avaliados, inclusive nos grupos A e S (prancha 2, figuras A e B). A DH é uma lesão aguda do hepatócito, precedida de tumefação e seguida pela formação de vacúolos de bordas indistintas na célula (BARROS, 2014). A DH resulta de agressões tóxicas, metabólicas e hipóxicas que levam à insuficiência na bomba de sódio e no potássio membranar. Nos grupos C esse fato pode ser facilmente explicado, uma vez que os ratos foram expostos não só à situação de toxicidade pela MCT como também à hipóxia, decorrente do quadro de HP e IC (congestão venosa passiva) estabelecido após vinte um dias de indução. No entanto, nos grupos A e S, não foi encontrado por nosso grupo uma explicação conclusiva. É possível, que algum tipo de toxicidade, mesmo que baixa, oriunda da “cama” e ou ração utilizada no manejo desses animais, tenha influenciado de alguma forma nossos resultados. Vale ressaltar, que

todos os cuidados foram devidamente tomados para evitar qualquer tipo de contaminação secundária. É importante comentar, que esta foi a única alteração histopatológica encontrada nos grupos A e S. Todas as outras estiveram presentes somente nos grupos C.

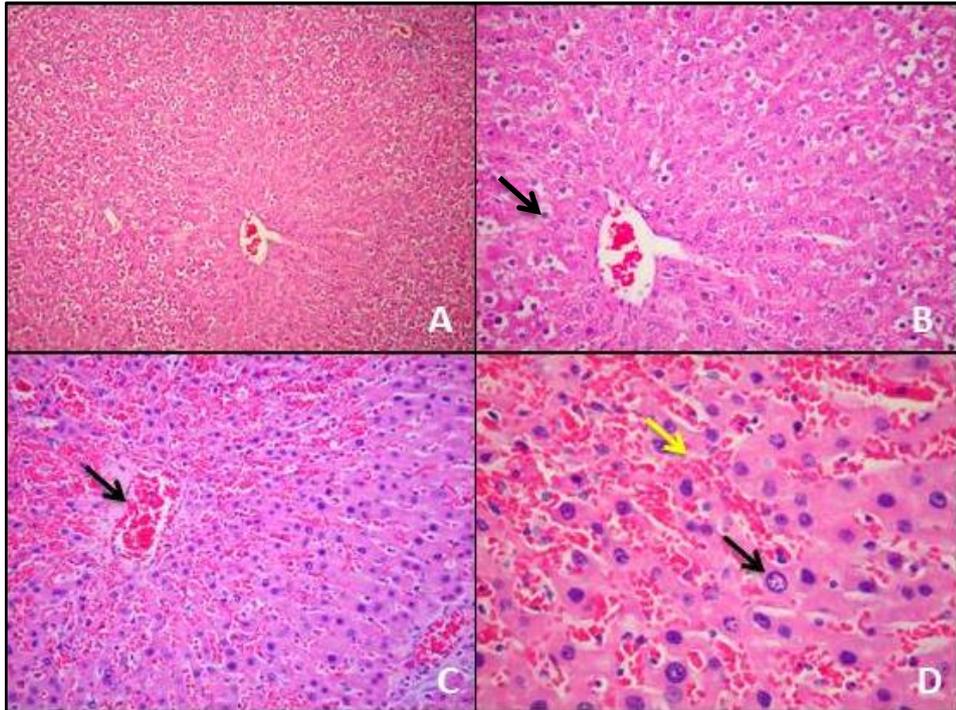
A megacariose foi a segunda lesão mais frequente em nosso estudo, estando presente nos grupos C – NAC 10 e 100mg (prancha 2, figura D). Segundo Cullen (2009), as principais lesões histopatológicas características de intoxicação pela DHA são megacariose, proliferação biliar e fibrose, corroborando em parte com nossos resultados. A megacariose resulta da ação antimitótica dos alcaloides pirrolizidínicos, que impedem a divisão celular, mas não a síntese de DNA, porque os hepatócitos tentam se dividir para repor aqueles que tenham sofrido necrose. Apesar desta alteração ser característica dos quadros de intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos, não é patognomônico, porque pode acontecer com outras toxinas como as aflatoxinas e nitrosaminas.

Outras lesões importantes visualizadas em nosso estudo foram congestão hepática e hemorragia hepática (focal e difusa), estando presente na frequência de 14,0% e 16%, respectivamente (pranchas 2 - figura C e 3 - figuras C e D). Características histopatológicas destas lesões foram observadas em todos os grupos C. Nos grupos A e S, essas alterações não estiveram presentes.

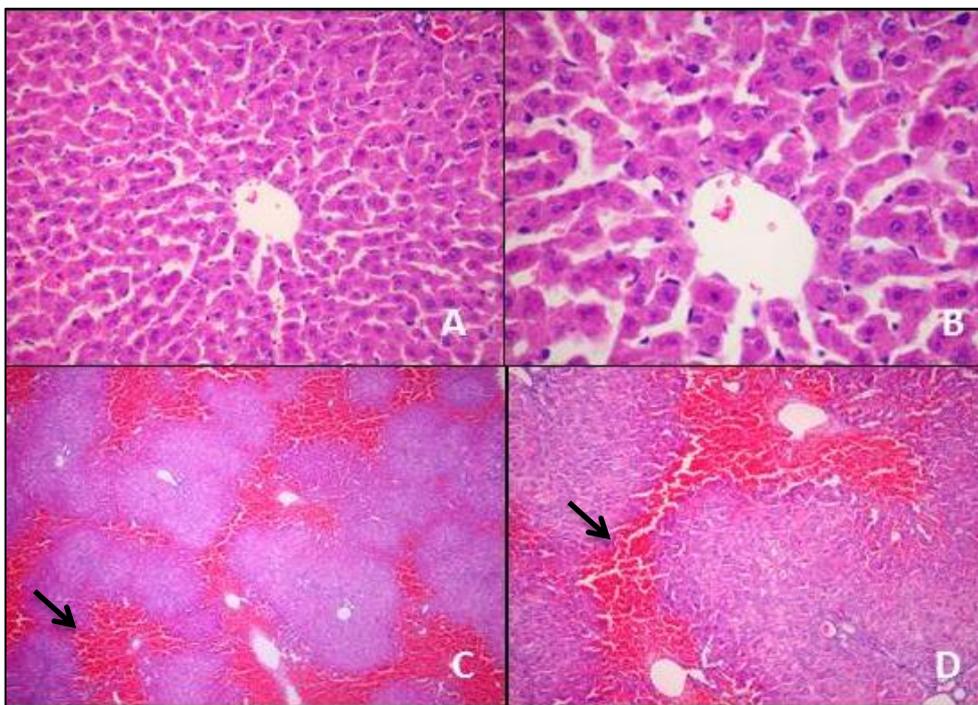
A congestão passiva pode ocorrer em qualquer espécie, e é quase sempre consequência de disfunção cardíaca (JONES et al., 2000). A ICD produz pressão elevada na veia cava caudal, que mais tarde envolve a veia hepática e seus afluentes (CULLEN, 2009). Microscopicamente, os sinusoides aparecem ingurgitados de sangue e dilatados. Em casos de ICD por período prolongado, o sangue acumula-se no centro do lóbulo, devido ao impedimento do efluxo venoso por estase sanguínea na circulação. Esse processo gera anóxia, lipidose e atrofia hepatocelular com consequente perda dos hepatócitos centrolobulares. Desse modo, os eritrócitos passam a ocupar os espaços deixados pelos hepatócitos perdidos, formando um “lago” de sangue. Essas alterações podem ser observadas também macroscopicamente, como acentuação do padrão lobular por áreas vermelhas (estase sanguínea) intercaladas com áreas mais claras de hepatócitos periportais mais ou menos íntegros (BARROS, 2014). De acordo com as descrições feitas por este autor, nossos achados corroboram com as alterações histopatológicas hepáticas, tanto congestivas quanto hemorrágicas, observadas em

situações de ICD (tabela 9). Pichardo et al. (1999) em estudo semelhante utilizando 50mg/kg de peso de MCT por vinte e um dias, não observaram sinais de congestão hepática. Observações semelhantes também foram relatadas por Hubscher (2005), utilizando 60mg/kg de peso de MCT no mesmo período. Contudo, Farahmand et al. (2004), após quarenta e dois dias da administração de MCT (60mg/kg), observaram congestão hepática quando comparado aos seus controles. Embora nossos resultados sejam semelhantes aos encontrados por estes autores, ressaltamos que a frequência das lesões foi baixa (tabela 9). Nosso período experimental foi de trinta e cinco dias. É possível que períodos de indução mais prolongados, pudessem influenciar nossos resultados.

A hiperplasia de ductos biliares (HDB) está representada em nosso estudo por 4% do total de lesões hepáticas, sendo encontrada somente no grupo C – NAC 100mg (prancha 4, figuras A e B). A HDB é uma resposta inespecífica a vários tipos de lesão hepática, sendo observada na maioria das vezes, em lesões de longa duração, como doenças que causam obstrução física ao fluxo biliar, ou como resposta a determinadas toxinas (BARROS, 2014). Acredita-se que esta lesão seja uma tentativa de regeneração do parênquima quando os hepatócitos perdem a capacidade de realizar essa função. Segundo Cullen (2009), a HDB é umas das principais alterações histopatológicas encontradas em fígado de animais intoxicados por alcaloides pirrolizidínicos, não sendo este fato observado em nossos resultados.



Prancha 2: Fotomicrografia de fígado de ratos. A. Degeneração hidrópica médio-lobular difusa. H/E, obj. 10X. B. Detalhe da imagem anterior evidenciando o processo degenerativo (seta). H/E, obj. 20X. C. Congestão centrolobular (seta) e sinusoidal. H/E, obj. 20X. D. Detalhe da imagem anterior mostrando a lesão sinusoidal (seta amarela) e megacarirose (seta preta). H/E, obj. 40X. Arquivo Pessoal, Setor de Morfologia/UENF, 2013.

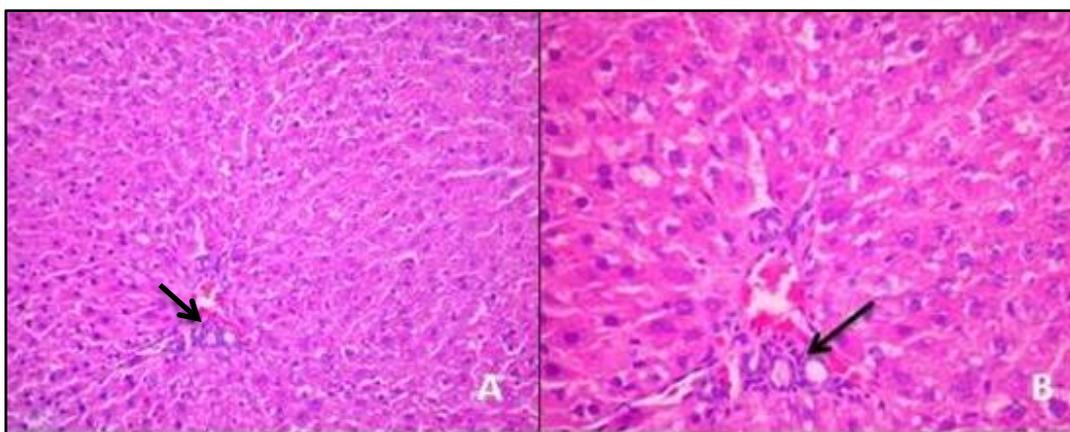


Prancha 3: Fotomicrografia de fígado de rato. A. Fígado com padrão histológico preservado. H/E, obj. 20X. B. Ampliação da imagem anterior mostrando hepatócitos e veia centro-lobular regulares. H/E, obj. 40X. C. Processo congestivo hemorrágico portal (seta). H/E, obj. 4X. D. Ampliação da figura anterior evidenciando processo congestivo hemorrágico (seta). H/E, obj. 10X. Arquivo pessoal, Setor de Morfologia/UENF, 2013.

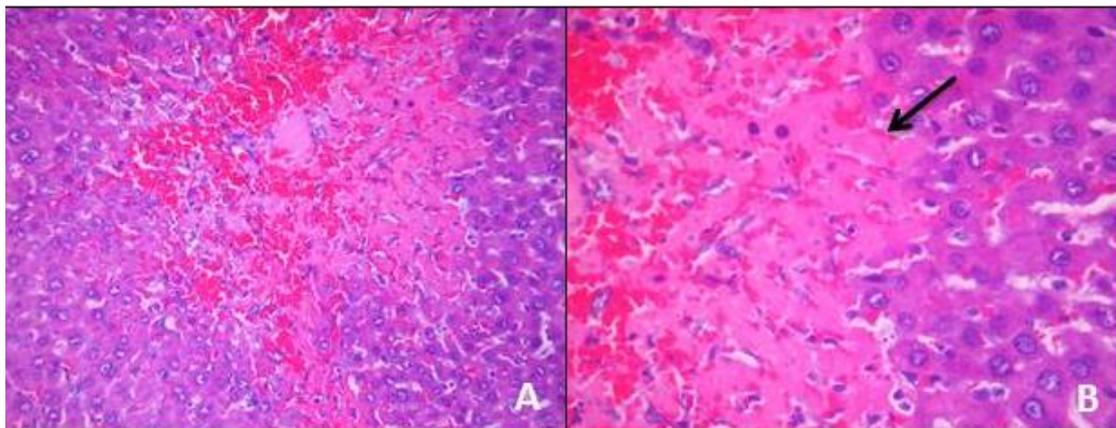
A telangiectasia (TLG) também foi observada em nosso estudo, no grupo C – PLAC, representando 2% dos casos. A TLG é uma importante dilatação dos capilares sinusoides em áreas de perda dos hepatócitos. Microscopicamente, observa-se ectasia do espaço sinusoidal e perda de hepatócitos. Normalmente não há evidências de inflamação ou fibrose associada a essa lesão (CULLEN, 2009).

A necrose hepática foi observada em apenas um caso (2%) do nosso estudo (prancha 5, figuras A e B), sendo no grupo C – NAC 10mg. A necrose hepática é deflagrada por uma lesão letal, sendo caracterizada por edema citoplasmático, destruição das organelas e rompimento da membrana plasmática. As células necróticas exibem tipicamente cariorrexia e fragmentação do corpo celular (CULLEN, 2009). Em situações de ICD e/ou insultos tóxicos como hepatotoxinas, a necrose centrolobular pode estar presente, em decorrência de situações hipóxicas devido à estase sanguínea, produzindo atrofia dos hepatócitos centrolobulares, além de maior atividade das oxidases, capaz de ativar compostos a formas tóxicas (BARROS, 2014). Segundo Rabbo (2005), a administração de MCT em baixas doses, não induz necrose hepática em ratos. Em nosso estudo, optamos pela utilização de baixa dose de MCT (60mg/kg), e possivelmente por este motivo, justifique a baixa frequência deste tipo de lesão.

Não foi observado neste estudo, efeito das diferentes doses de NAC sobre as lesões histopatológicas hepáticas, nos animais do grupo C. Contudo, a dose de 300mg/kg demonstrou as menores frequências. Da mesma forma, nenhum efeito foi observado para os animais do grupo S, tratados com as diferentes doses de NAC.



Prancha 4: Fotomicrografia de fígado de ratos. A. Hiperplasia de ductos biliares (seta). H/E, obj. 10X. **B.** Ampliação da imagem anterior evidenciando ductos biliares hiperplásicos (seta). H/E, obj. 20X. Arquivo pessoal, Setor de Morfologia/UENF, 2013.



Prancha 5: Fotomicrografia de fígado de rato. A. Área de contornos irregulares e contidos, hialina e levemente eosinofílica (necrose de coagulação). H/E, obj. 20X. B. Ampliação da imagem anterior evidenciando área de necrose (seta). H/E, obj. 40X. Arquivo pessoal, Setor de Morfologia/UENF, 2013.

4.3.2 Histopatologia Renal

Em nosso estudo, nenhum dos grupos avaliados apresentou lesões renais em sua estrutura macroscópica e/ou microscópica, estando todos dentro dos padrões de normalidade. Esses achados vão ao encontro com as citações feitas por Wilson et al. (1992), que relatam a ocorrência de doença renal apenas em suínos e aves após indução com MCT. Segundo Soto-Blanco et al. (2001), a DHA um composto ativo oriundo do metabólismo da MCT, ao ser transportado até os rins pode causar lesão neste órgão.

Entretanto, em nossas análises bioquímicas séricas, observamos valores de creatinina mais elevados no grupo C – PLAC quando comparado ao grupo A (tabela 7), e a ureia apesar de não estar estatisticamente superior nesse grupo, apresenta valores consideravelmente maiores também quando comparado ao grupo A. Desta forma, podemos pensar em uma situação de azotemia pré-renal, onde a redução do fluxo renal secundário ao débito cardíaco insuficiente, comum nos casos de IC, possa ser a causa desses resultados. Uma vez reduzido o fluxo renal, o filtrado glomerular passa muito lentamente pelos túbulos renais, permitindo que todo ele seja reabsorvido, e os rins deixam de eliminar os produtos catabólicos necessários à homeostase, neste caso, ureia e creatinina.

4.3.3 Histopatologia Cardíaca

A cerca dos achados histopatológicos cardíacos obtidos nos grupo C destacam-se (tabelas 10 e 11):

- a) Atriais: degeneração hialina (44,6%), aumento de celularidade intersticial (16,0%), hipertrofia (16,0%), edema intersticial (7,0%) e infiltrado mononuclear (7,0%). Outras lesões também foram identificadas, porém com menor frequência como megacariose, fibrose, necrose, hipercontração de fibras e rbdomiólise;
- b) Ventriculares: aumento da celularidade intersticial (28,7%), infiltrado mononuclear (18,7%), degeneração hialina (16,2%), hipertrofia (16,2%), necrose (7,5%) e fibrose (3,8%). Lesões com menor frequência foram edema intersticial, megacariose, hipercontração das fibras e rbdomiólise.

Nossos resultados revelaram que a maior parte das lesões foi observada no átrio e ventrículo direito, 79,0% e 59%, respectivamente, como era esperado, uma vez que a MCT utilizada como toxina de indução, culmina com um quadro de *Cor pulmonale* e ICD. No átrio direito, a lesão mais observada foi a degeneração hialina (33,3%), e no ventrículo direito foram o aumento da celularidade intersticial (27,6%) e hipertrofia (17,0%). A IC inicia-se pelo desenvolvimento de uma doença cardíaca ou pelo aumento da carga de trabalho associada à doença pulmonar, renal ou vascular, levando à perda de reserva cardíaca, à redução do fluxo sanguíneo periférico e ao acúmulo de sangue nas câmaras. Com isto inúmeros mecanismos compensatórios são disparados como vasoconstrição, aumento da resistência vascular e hipervolemia, gerando um ciclo vicioso de descompensação cardíaca e insuficiência do órgão (VLEET, FERRANS, 1986). A ICD resulta em congestão passiva, sendo evidenciada na forma de ascite, hidrotórax e edema subcutâneo. Esses achados conforme citado anteriormente, foram comuns em nosso modelo experimental, confirmando o sucesso do protocolo adotado.

Com relação às lesões observadas nas câmaras esquerdas, pode comentar que no átrio, o número de lesões foi infrequente, 21%, sendo a degeneração hialina a mais observada, com um percentual de 90%. No ventrículo esquerdo, a ocorrência de lesões foi mais expressiva, 41%, sendo o aumento de celularidade intersticial (27,6%) o mais frequente.

Tabela 10. Lesões histopatológicas atriais em ratos Wistar portadores de *Cor pulmonale* induzidos por MCT, sobre efeito de N-acetilcisteína (NAC) no período experimental. Setor de Morfologia/UENF, 2013.

| Lesões | | Concentrações de NAC | | | | | | | | | | | | | | | | Total |
|-----------------------|-----|----------------------|---|------|---|----|---|----|---|-----|---|----|---|-----|---|----|----|-------|
| | | Controle | | PLAC | | 10 | | | | 100 | | | | 300 | | | | |
| | | A | | C | | S | | C | | S | | C | | S | | C | | |
| | | E | D | E | D | E | D | E | D | E | D | E | D | E | D | E | D | |
| de menor gravidade | DHF | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 11 |
| | DHM | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 | 0 | 0 | 1 | 1 | 14 |
| | MGC | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | EIF | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| | IMF | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| | IMM | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | CIF | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | CIM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 5 |
| | CID | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Subtotal | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 5 | 8 | 0 | 0 | 3 | 8 | 0 | 0 | 3 | 8 | 43 | |
| de maior gravidade | HAF | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | HAM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 6 |
| | HAD | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | NAF | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | FAF | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | HCF | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | RBM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Subtotal | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 | 14 | |
| Total | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 5 | 13 | 0 | 0 | 3 | 12 | 0 | 0 | 3 | 12 | 56 | |

Legenda: (PLAC) placebo; (A) controle absoluto; (S) sem e (C) com indução experimental de *Cor pulmonale* com monocrotalina; (E) átrio esquerdo e (D) direito; (DHF) degeneração hialina focal e (DHM) multifocal; (MGC) megacariose; (EIF) edema intersticial focal; (IMF) inflamação mononuclear focal e (IMM) multifocal; (CIF) celularidade intersticial focal, (CIM) multifocal e (CID) difusa; (HMF) hipertrofia atrial focal; (HAM) multifocal e (HAD) difusa; (NAF) necrose atrial focal; (FAM) fibrose atrial multifocal; (HCF) hipercontração das fibras miocárdicas e (RBM) rabidomiólise; (n= 5-7; N= 43).

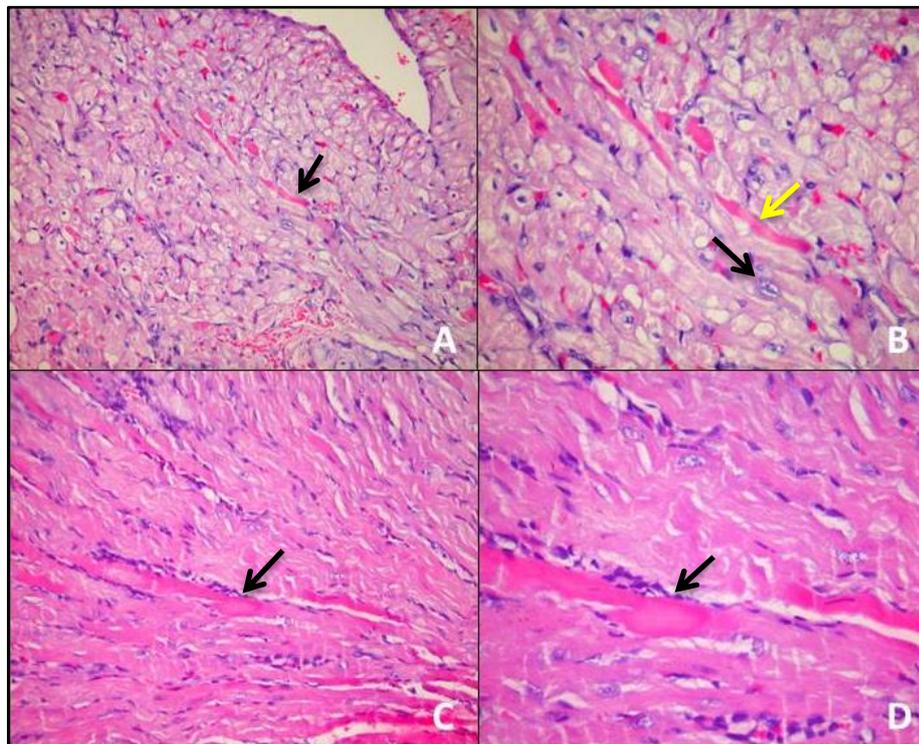
Tabela 11. Lesões histopatológicas ventriculares em ratos Wistar portadores de *Cor pulmonale* induzidos por MCT, sobre efeito de N-acetilcisteína (NAC) no período experimental. Setor de Morfologia/UENF, 2013.

| Lesões | | Concentrações de NAC | | | | | | | | | | | | | | | | Total | |
|-----------------------|-----|----------------------|---|------|----|----|---|-----|----|-----|---|---|----|---|---|---|----|-------|----|
| | | Controle | | PLAC | | 10 | | 100 | | 300 | | | | | | | | | |
| | | A | | C | | S | C | S | C | S | C | S | C | | | | | | |
| | | E | D | E | D | E | D | E | D | E | D | E | D | E | D | E | D | | |
| de menor gravidade | DHF | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | |
| | DHM | 0 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | |
| | MGC | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | |
| | EIF | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | |
| | IMF | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 |
| | IMM | 0 | 0 | 4 | 3 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 |
| | IMD | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | CIF | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 10 |
| | CIM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 11 |
| | CID | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Subtotal | | 0 | 0 | 9 | 11 | 0 | 0 | 8 | 6 | 0 | 0 | 6 | 9 | 0 | 0 | 0 | 6 | 55 | |
| de maior gravidade | HMF | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | |
| | HMM | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 9 | |
| | HMD | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | |
| | NVF | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | |
| | NVM | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| | FVM | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| | HCF | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | RBM | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| Subtotal | | 0 | 0 | 7 | 2 | 0 | 0 | 2 | 5 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 5 | 25 | |
| Total | | 0 | 0 | 16 | 13 | 0 | 0 | 10 | 11 | 0 | 0 | 7 | 12 | 0 | 0 | 0 | 11 | 80 | |

Legenda: PLAC (placebo); (A) controle absoluto; (S) sem e (C) com indução experimental de *Cor pulmonale* com monocrotalina; (E) ventrículo esquerdo e (D) direito; (DHF) degeneração hialina focal e (DHM) multifocal; (MGC) megacariose; (EIF) edema intersticial focal; (IMF) inflamação mononuclear focal e (IMM) multifocal; (CIF) celularidade intersticial focal, (CIM) multifocal e (CID) difusa; (HMF) hipertrofia miocárdica focal; (HMM) multifocal e (HMD) difusa; (NVF) necrose ventricular focal; (NVM) multifocal; (FVM) fibrose ventricular multifocal; (HCF) hipercontração das fibras miocárdicas e (RBM) rabidomiólise; (n= 5-7; N= 43).

A lesão atrial (direita e esquerda) mais frequente em nosso estudo foi a degeneração hialina (DHI), estando presente em todos os grupos C, sob a apresentação de lesões focais e multifocais. Nos ventrículos, esta lesão também foi bastante frequente, estando presente em todos os grupos C em uma distribuição multifocal (prancha 6). A DHI no miocárdio é algo relativamente comum, sendo caracterizada pelo acúmulo de material acidófilo no interior dos cardiomiócitos oriundo da coagulação de proteínas (OCARINO et al., 2014). Em situações simples, a célula sofre agressão, ocorre a dissolução do sarcoplasma, que fica homogêneo, com consequente ruptura da fibra muscular e perda das suas estriações. Essa alteração geralmente é focal. Em situações mais agressivas ou persistentes, esta

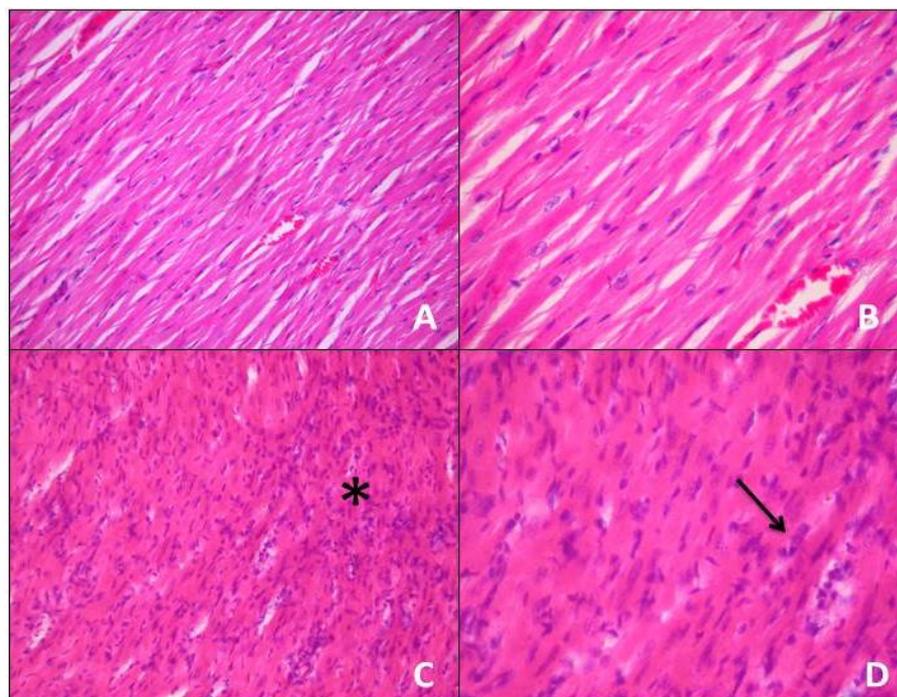
lesão pode progredir para um quadro de necrose, também conhecido como *necrose de Zencker* (THONSON, 1990). As principais causas de DHI são: situações tóxico-infecciosas (endotoxinas bacterianas, viral), intoxicações exógenas e deficiência de selênio e/ou vitamina E (SANTOS, 1979). Pichardo et al. (1999) em estudo semelhante ao nosso, observaram importante redução nos níveis de vitamina E no VD. Silva (2011) em outro estudo na mesma linha de pesquisa, após trinta e um dias da administração da MCT, constatou redução na concentração da vitamina C (ácido ascórbico) no VE. Para evitar a propagação das reações em cadeia, os tecidos gastam antioxidantes não-enzimáticos, tais como a Vit. C, necessária para a regeneração da Vit. E (KARAJIBANI et al., 2010). Em nosso estudo, não mensuramos as concentrações das defesas antioxidantes não-enzimáticas, e por este motivo não podemos afirmar o envolvimento da Vit. E com este tipo de lesão. Mas, sugerimos que a frequência da degeneração hialina assim como da necrose de *Zenker* possa estar envolvida com esta deficiência. É necessário, que em estudos futuros, essa análise seja incluída.



Prancha 6: Fotomicrografia de coração de rato. A. Degeneração hialina de miocardiócitos individuais em átrio (seta). H/E, obj. 10X. B. Ampliação da imagem anterior onde pode ser visto degeneração hialina de fibra miocárdica (seta amarela), e miocardiócitos demonstrando megacariose (seta preta). H/E, obj. 20X. C. Degeneração hialina de miocardiócitos individuais em ventrículo (seta). H/E, obj. 20X. D. Ampliação da imagem anterior onde pode ser observado degeneração hialina de miocardiócitos (seta). H/E, obj. 40X. Arquivo pessoal, Setor de Morfologia/UENF, 2013.

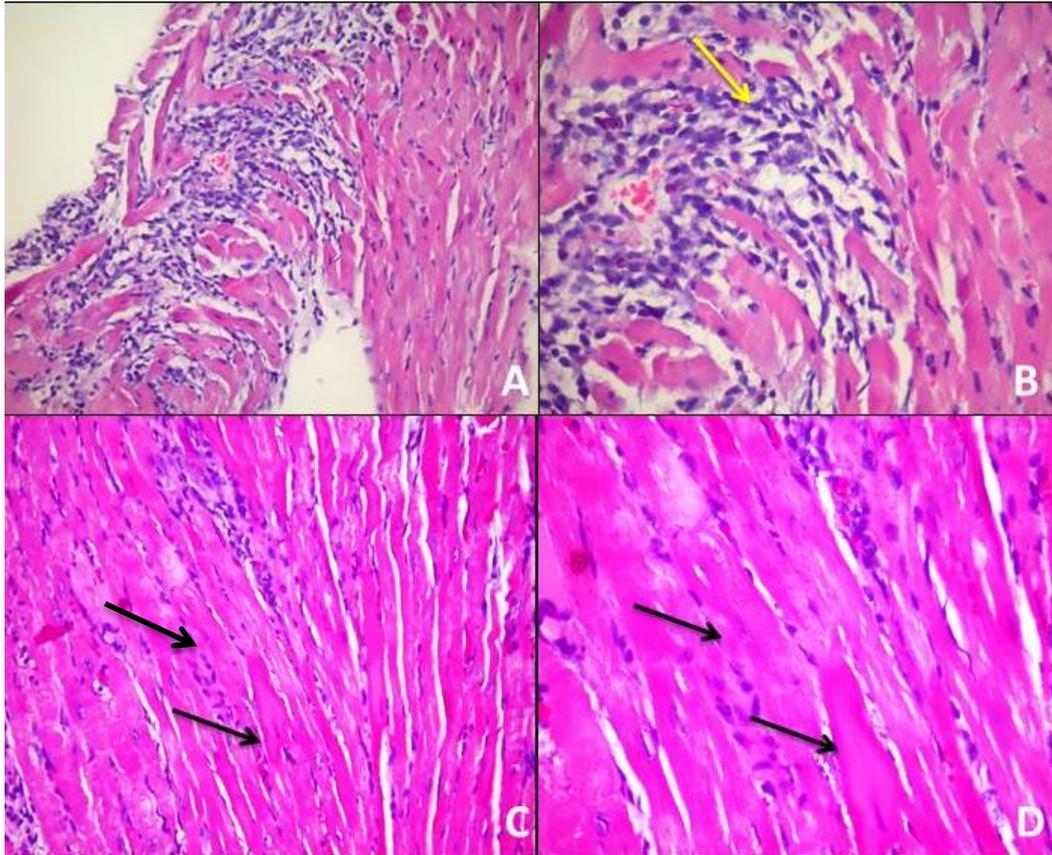
Com relação aos ventrículos, a lesão mais observada em nosso estudo foi o aumento de células intersticiais (CI) (prancha 7, figuras C e D), seguido por infiltrado mononuclear (IM) (prancha 8, figuras A e B) e hipertrofia miocárdica (HM) (prancha 8, figuras C e D), apresentando-se como lesões focais, multifocais e difusas. No átrio direito, estas lesões também foram frequentes, exceto infiltrado mononuclear, com os mesmos padrões de distribuição. Características histopatológicas dessas lesões foram observadas somente nos grupos C.

Em nosso estudo, a CI está representada pelo aumento de fibroblastos no tecido intersticial, originando um tecido conectivo jovem. O aumento da CI assim como do IM caracterizam quadros de estimulação crônica, que podem evoluir para lesões miocárdica letais como a necrose, encontrada também em nossos resultados. Segundo Vleet e Ferrans (1986), a inflamação miocárdica com necrose secundária pode ser confundida com uma necrose miocárdica, pois ambas as lesões apresentam um infiltrado leucocitário significativo. Neste caso, a análise histopatológica se torna limitada em relação a um diagnóstico específico, sendo o diagnóstico etiológico difícil de ser alcançado a partir de alterações morfológicas.



Prancha 7: Fotomicrografia de coração (ventrículo esquerdo) de rato. A. Tecido muscular estriado cardíaco normal (animal A – Controle). H/E, obj. 10X. B. Ampliação da imagem anterior onde pode ser visto miocardiócitos sem alteração histológica. H/E, obj. 20X. C. Aumento de celularidade intersticial (asterisco). H/E, obj. 10X. D. Ampliação da imagem anterior onde se observa o aumento numérico de fibroblastos intersticiais (seta). H/E, obj. 20X. Arquivo pessoal, Setor de Morfologia/UENF, 2013.

A HM representa um aumento na massa muscular, resultante do aumento no tamanho das células musculares cardíacas (VLEET, FERRANS, 1986). Durante seu desenvolvimento, o cardiomiócito sofre inúmeras modificações e, na fase adulta, é passível de ser alterado em decorrência de determinadas doenças. A hipertrofia miocárdica é provavelmente o melhor exemplo de adaptação de uma estrutura celular à estimulação (TERRACIO, THOMAS, 1998). Em geral, a HM é secundária, sendo uma resposta compensatória à carga excessiva de trabalho. Esta sobrecarga pode ser por excesso de volume, promovendo uma hipertrofia excêntrica, ou ainda por aumento de pressão, resultando em hipertrofia concêntrica (OCARINO et al., 2014), sendo este o tipo de lesão induzida em nosso estudo. Neste caso, a HM resulta da ação da MCT, que ao cair na circulação, causa proliferação celular nas arteríolas pulmonares, impedância ao fluxo sanguínea, com aumento da pressão na artéria pulmonar e hipertrofia compensatória do VD (SILVA, 2011). Na manifestação patológica, a reestruturação do tecido cardíaco tem a finalidade de compensar uma redução na função contrátil do coração (WAKATSUKI et al., 2004). Tal processo é transitório, e em longo prazo, ocorre a deterioração da função, com redução do tecido contrátil e substituição de tecido funcional por tecido fibroso (BELERENIAN et al., 2007). Microscopicamente os cardiomiócitos apresentam-se aumentados em um padrão desorganizado, com núcleos grandes, podendo estar associado a um aumento nos fibroblastos intersticiais (VLEET, FERRANS, 1986). Segundo Ocarino et al. (2014), áreas de fibrose também podem estar presentes. Nossos resultados corroboram com essas citações (tabelas 10 e 11), podendo ser ilustrado através da figura 24, reafirmando o correto estabelecimento do modelo experimental proposto.



Prancha 8: Fotomicrografia de coração (ventrículo direito) de rato. A. Infiltrado inflamatório mononuclear de permeio aos miocardiócitos. H/E, obj. 10X. B. Ampliação da imagem anterior onde podem ser evidenciadas células inflamatórias mononucleares infiltrando-se por entre os miocardiócitos (setas). H/E, obj. 20X. C. Hipertrofia de miocardiócitos (seta). H/E, obj. 20X. D. Ampliação da imagem anterior onde fica evidente a hipertrofia dos miocardiócitos (setas). H/E, obj. 40X. Arquivo pessoal, Setor de Morfologia/UENF, 2013.

Outras lesões importantes foram visualizadas em nosso estudo, como a necrose e fibrose miocárdica, com padrões de distribuição variando entre focal e multifocal (prancha 9). Características histopatológicas destas lesões foram observadas somente nos grupos C.

A necrose miocárdica pode apresentar inúmeras causas, dentre elas deficiências nutricionais (vitamina E e selênio), toxinas químicas e herbáceas, isquemias, distúrbios metabólicos, doenças hereditárias e lesões físicas. Microscopicamente, a aparência dependerá do tempo da lesão. Nas necroses recentes, as fibras aparecem edemaciadas e hipereosinofílicas, também chamadas de necrose hialina (prancha 6) (VLEET, FERRANS, 1986). Este achado foi frequentemente observado em nosso estudo, sendo comentado anteriormente. Em um segundo padrão de necrose, os cardiomiócitos podem se apresentar com aspecto “esfarrapado”, devido à hipercontração das fibras e à formação de diversas

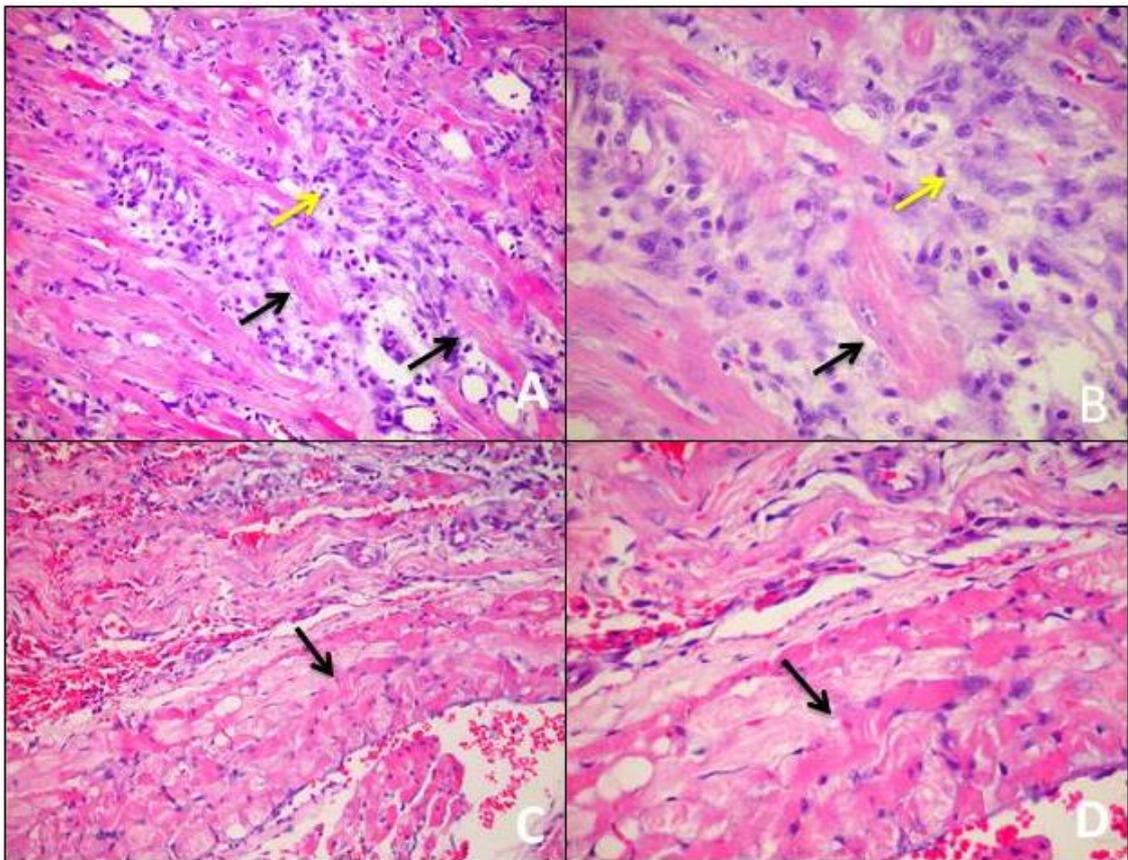
“barras” de material contrátil rompido, orientadas transversalmente (ruptura das fibras/rabdomiólise). Estas alterações também foram observadas em nossos resultados, entretanto com baixa frequência (prancha 9). E um terceiro padrão pode ser observado, em casos de necrose isquêmica extensa, onde os miócitos apresentam características de necrose de coagulação, com elementos contráteis frouxos ao invés de hipercontraídos (VLEET, FERRANS, 1986). Este último, não foi observado em nossas análises.

De 24 a 48h após a lesão, as áreas necróticas são infiltradas por células inflamatórias, principalmente macrófagos e alguns neutrófilos, que fagocitam e lisam os debris celulares necróticos. Como citados anteriormente, em estágios iniciais, torna-se difícil distinguir lesões necróticas de alguns tipos de miocardite. Com a progressão da necrose, as lesões assumirão características de um tecido estromal, com a presença de fibroblastos, colágeno e capilares, além de “tubos” vazios de lâminas basais, anteriormente ocupados por cardiomiócitos necróticos. A fase cicatricial, ou também chamada de fibrose, caracteriza-se pela proliferação de células do tecido conjuntivo (fibroblastos), e pela deposição de componentes do tecido conjuntivo, como colágeno, tecido elástico e mucopolissacarídeos ácidos (VLEET, FERRANS, 1986). Esses diferentes estágios da lesão, foram obtidos em nosso estudo, sendo ilustrados nas pranchas 9 e 10. Com o objetivo de confirmar a ocorrência de lesão fibrótica e a presença de colágeno depositado no miocárdio ventricular, utilizou a técnica de coloração picro-sírius (prancha 10, figuras C e D). A mesma é utilizada em histologia como sendo específica para colágenos, aumentando a birrefringência deste material (ALMEIDA et al., 1988). Vale ressaltar que além da ação indireta da MCT sobre o tecido cardíaco, estabelecendo um quadro de *Cor pulmonale*, a provável deficiência da Vit. E (discutida anteriormente), também pode estar associada com esses resultados, evidenciando sinais de remodelamento cardíaco no período experimental de trinta e cinco dias.

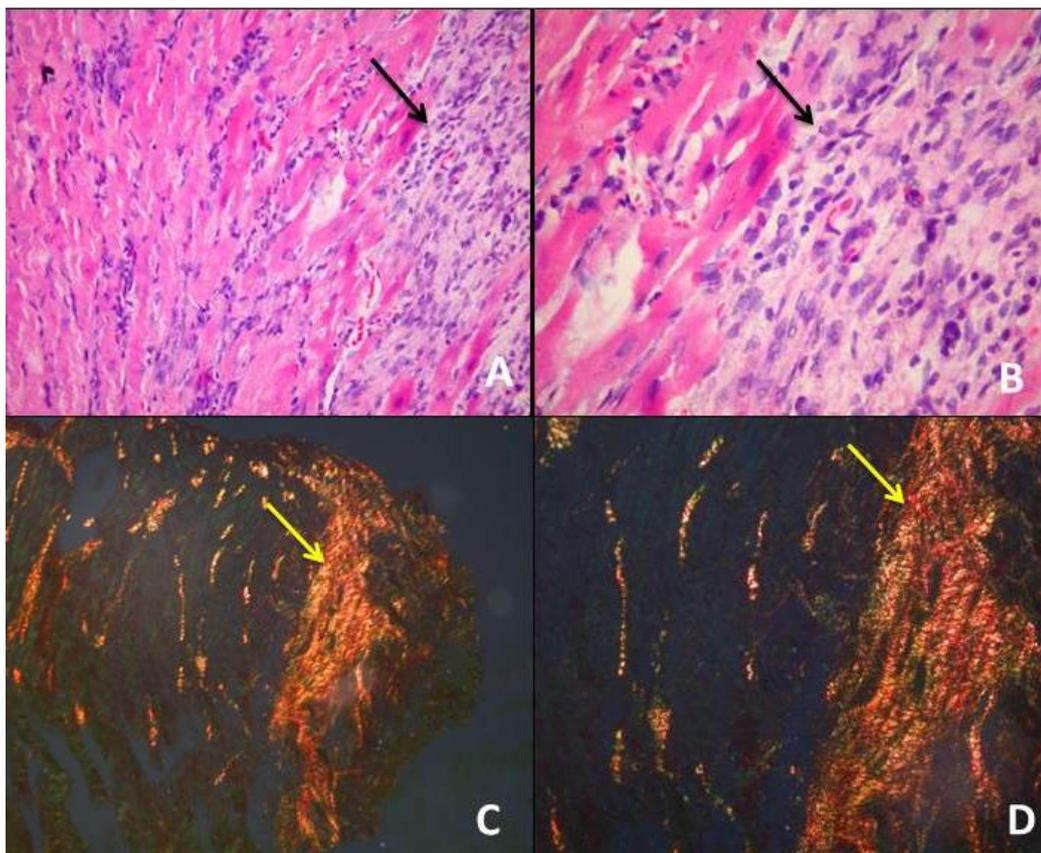
Com relação às diferentes doses de NAC testadas, foi observado que esta droga parece ter atuado de forma positiva na redução da frequência das lesões, especialmente no ventrículo esquerdo, sugerindo a dose de 300mg como a mais eficiente (tabelas 10 e 11). Todavia, nos átrios, este efeito não foi observado. Este fato pode ser interessante, uma vez que quadros de *Cor pulmonale* envolvendo também disfunção ventricular esquerda apresentam uma condição clínica mais debilitante. Silva (2011) em estudo semelhante ao nosso, investigou além de

disfunções no VD, alterações hemodinâmicas no VE. Ele constatou trinta e um dias após a administração de MCT, importantes alterações na função sistólica e diastólica do VE. Em nosso estudo, acreditamos que uma associação entre a disfunção do VD e VE tenha sido a causa dos óbitos registrados, refletindo maior gravidade do quadro, e corroborando com as citações feitas por este autor.

Não foi observado em nosso estudo, lesões histopatológicas nos grupos A e S (placebo, 10, 100 e 300mg/kg), reafirmando os comentários de Kelly (1998), que afirma ser a NAC, uma droga segura e com raros efeitos colaterais.



Prancha 9: Fotomicrografia de coração (ventrículo direito) de rato. **A.** Infiltrado inflamatório mononuclear e fibrose incipiente (seta amarela) de permeio aos miocardiócitos rompidos (setas pretas). H/E, obj. 20X. **B.** Ampliação da imagem anterior onde podem ser evidenciadas células inflamatórias mononucleares e fibrose incipiente (seta amarela) circundando um miocardiócito rompido (seta preta). H/E, obj. 40X. **C.** Miocardiócitos hipertrofiados e hipercontraídos (seta). H/E, obj. 20X. **D.** Ampliação da imagem anterior onde fica evidente a hipertrofia dos miocardiócitos e hipercontração de fibras individuais (seta). H/E, obj. 40X. Arquivo pessoal, Setor de Morfologia/UENF, 2013.



Prancha 10: Fotomicrografia de coração (ventrículo direito) de rato. **A.** Miocardiócitos necróticos foram removidos por fagocitose pelos macrófagos e a área está passando por um processo de fibrose (seta). H/E, obj. 20X. **B.** Ampliação da imagem anterior onde podem ser vistos miocardiócitos íntegros ao lado de processo fibrótico (seta). H/E, obj. 40X. **C.** Observa-se aumento de depósito de tecido conjuntivo no miocárdio (seta). Picro-sírius, material visualizado sob luz polarizada, obj. 10X. **D.** Ampliação da imagem anterior (seta). Picro-sírius, material visualizado sob luz polarizada, obj. 20X. Arquivo pessoal, Setor de Morfologia/UENF, 2013.

4.3.4 Hipertrofia Cardíaca Direita (HCD)

A hipertrofia cardíaca foi avaliada através da razão do peso cardíaco isolado (PCI) pelo peso corporal final (PCF), e a razão do peso do ventrículo direito (PVD) pelo peso S + VE (PSVE), expressos em g/mg e g/g. A relação da massa do VD pelo PCF e PSVE indica a hipertrofia ventricular direita.

Para a variável hipertrofia cardíaca, especificamente no VD, verificou que pesos mais elevados foram obtidos para os animais do grupo C (PLAC, NAC10 e 100), quando comparado aos animais do grupo A e C-NAC300, sendo estes resultados significativamente estatísticos ANOVA ($p \leq 0,05$). Os valores de média \pm erro padrão estão ilustrados na tabela 12. Quando estabeleceu a relação PVD/PSVE

esses resultados se repetiram (figura 17). Entretanto, quando a relação PCI/PCF foi obtida, verificou que pesos mais elevados foram encontrados para os animais do grupo C (PLAC, NAC10 e 100), quando comparado aos animais do grupo A, assim como para os animais do grupo C (NAC 10 e 100), quando comparados ao grupo C – NAC300, sendo estes resultados significativamente estatísticos ANOVA ($p \leq 0,05$).

Tabela 12. Comparação entre médias (\pm Erro Padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5% ($P \leq 0,05$) para as variáveis hipertrofia cardíaca direita (VD) em ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC) em condições laboratoriais (n= 5-7; N= 43). Setor de Morfologia/UENF, 2013.

| Groups (G): | A | | C | | | S | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | CONT | PLAC | NAC 10mg | NAC 100mg | NAC 300mg | PLAC | NAC 10mg | NAC 100mg | NAC 300mg |
| Variáveis | | | | | | | | | |
| PESO VD (g) | 0,22 ^c (0,01) | 0,42 ^a (0,01) | 0,46 ^a (0,01) | 0,45 ^a (0,01) | 0,36 ^b (0,01) | 0,17 (0,01) | 0,21 (0,02) | 1,19 (0,02) | 1,18 (0,01) |
| PVD X PSVE (g/g) | 0,19 ^c (0,01) | 0,36 ^a (0,01) | 0,37 ^a (0,01) | 0,38 ^a (0,01) | 0,30 ^b (0,01) | 0,18 (0,01) | 0,20 (0,01) | 0,21 (0,01) | 0,18 (0,01) |
| PCI X PCF (g/mg) | 2,77 ^c (0,07) | 3,72 ^{ab} (0,10) | 4,12 ^a (0,06) | 4,04 ^a (0,11) | 3,26 ^{bc} (0,13) | 2,72 (0,09) | 2,88 (0,13) | 2,76 (0,07) | 2,58 (0,06) |

Legenda: A = controle absoluto; S = animais sem indução com monocrotalina (MCT); C = animais com indução com MCT; CONT = controle; PLAC = placebo (solução sorbato de potássio); NAC 10mg, 100mg e 300mg = N-acetilcisteína 10mg/kg, 100mg/kg e 300mg/kg; VD = ventrículo direito; PVD/PSVE = peso do ventrículo direito (grama) dividido pelo peso do septo interventricular + ventrículo esquerdo (grama por grama); PCI/PCF = peso do coração isolado dividido pelo peso corpóreo final (grama por miligrama). Médias seguidas pela mesma letra (grupo A versus grupos C) não diferem entre si, segundo o teste de Bonferroni's ($P \leq 0,05$). * Médias não diferem entre si (grupo A versus grupos S) segundo o teste de Bonferroni's ($P \leq 0,05$).

Segundo alguns autores, uma das principais características apresentadas pelo modelo experimental induzido com MCT é o desenvolvimento de hipertrofia compensatória do VD, a partir da terceira semana de tratamento (HILL et al., 1989; BERNOCCHI et al., 1996; FARAHMAND et al., 2004; RABBO et al., 2008; LUDKE et al., 2010). Para DeMarco et al. (2010), esta hipertrofia acontece em decorrência de uma disfunção endotelial dos vasos pulmonares com consequente aumento de pós-carga imposta ao VD, estimulando o processo hipertrófico da câmara. Assim como era esperado, a HCD foi observada em nossos animais pertencentes ao grupo C,

trinta e cinco dias após injeção com MCT, corroborando com esses autores, e demonstrando mais uma vez, o sucesso do protocolo experimental adotado.

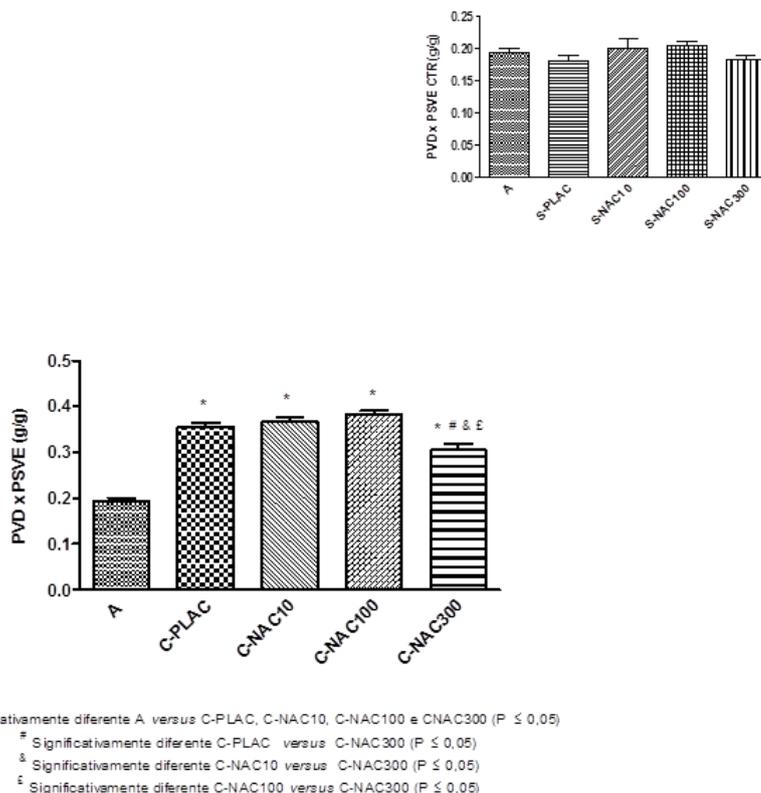


Figura 17. Hipertrofia cardíaca direita em ratos induzidos com MCT a *Cor pulmonale* e tratados com N-acetilcisteína (NAC), pela relação PVD/PSVE (g/g), sob condições laboratoriais. Valores expressos em média (\pm erro padrão) pelo teste de Bonferroni's na probabilidade de 5%. Gráfico em maior destaque - Eixo Y: relação entre o peso do ventrículo direito dividido pelo peso do septo interventricular + ventrículo esquerdo; Eixo X: A (controle absoluto = SHAM), C-PLAC (monocrotalina + solução placebo composta por sorbato de potássio e água), C-NAC10 (MCT + 10mg/kg de n-acetilcisteína – NAC), C-NAC100 (MCT + 100mg/kg NAC) e C-NAC300 (MCT + 300mg/kg NAC); Gráfico em menor destaque – Eixo X: S-PLAC (placebo), S-NAC10 (10mg/kg NAC), S-NAC100 (100mg/kg NAC) e S-NAC300 (300mg/kg NAC); (n= 5-7; N= 43).

* Significativamente diferente quando comparado ao grupo A ($P \leq 0,05$).

Significativamente diferente quando comparado ao grupo C-PLAC ($P \leq 0,05$).

& Significativamente diferente quando comparado ao grupo C-NAC10 ($P \leq 0,05$).

£ Significativamente diferente quando comparado ao grupo C-NAC100 ($P \leq 0,05$).

Em nosso estudo, os resultados referentes aos grupos C-NAC10 e 100 não revelaram diferença estatística quando comparados ao grupo C-MCT, sugerindo uma ineficiência destas doses com relação à HCD. Entretanto, a dose de NAC 300mg/kg mostrou resultado estatístico significativo comparado ao grupo C-PLAC (tabela 12), sugerindo efeito terapêutico satisfatório com relação a esta variável. Resultados semelhantes foram obtidos por Chaumais et al. (2014) ao utilizar a dose

de 500mg/kg de NAC em ratos com HAP induzida por MCT. Segundo estes autores, a NAC promove proteção cardíaca neste modelo experimental através de suas propriedades imunomoduladoras, antioxidantes e anti-inflamatórias, gerando benefícios sobre a vasculatura pulmonar e função cardíaca direita.

Silva (2011) em análise temporal dos efeitos da MCT em ratos, verificou uma correlação positiva entre hipertrofia ventricular direita (HVD) e índice de performance miocárdica (PMI), sugerindo que a hipertrofia esteja relacionada ao aumento da resistência promovida pela HAP com consequente aumento de trabalho do VD, influenciando a mecânica do VE. Esses resultados indicam um maior esforço miocárdico e maior gasto energético, podendo ser um fator contribuinte para o desenvolvimento de IC. Neste mesmo estudo, o autor obteve ao analisar o índice de HVD *versus* pico de onda E, uma significativa correlação inversa. Ou seja, quanto maior a HVD, menor o fluxo sanguíneo transmitral durante o enchimento rápido do VE, sugerindo disfunção diastólica ventricular, aos trinta e um dias após MCT. Portanto, reduções nos níveis de HVD como os observados em nosso estudo no grupo C-NAC 300, podem sugerir boas perspectivas terapêuticas com relação ao retardo da instalação de IC, e com relação à melhora dos parâmetros hemodinâmicos.

Não foi observado em nosso estudo, resultado estatisticamente significativo ANOVA ($p \leq 0,05$) entre os grupos A e S (placebo, 10, 100 e 300) para a variável hipertrofia cardíaca (VD) (tabela 12).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

1 - A dispneia e a redução do apetite foram os sinais clínicos mais frequentes nos animais pertencentes ao grupo C, e as diferentes doses de NAC administradas não foram capazes de reverter esses resultados;

2 - A ocorrência de edema pulmonar esteve presente em todos os casos de óbitos sugerindo hipóxia importante, aumento da permeabilidade vascular e maior gravidade do quadro. As diferentes doses de NAC não foram capazes de influenciar positivamente esses resultados;

3 - Os animais tratados com MCT apresentaram diminuição no ganho de peso corpóreo a partir de vinte e um dias de indução, exceto os pertencentes ao grupo C-NAC300 que permaneceram com ganho de peso;

4 - Os animais induzidos com MCT apresentaram valores significativamente elevados de ALT e AST, revelando dano hepatocelular. As diferentes doses de NAC administradas não foram capazes de reverter esses valores;

5 - Não houve diferença nos resultados das variáveis FA, albumina e ureia entre os grupos experimentais;

6 - Os animais pertencentes ao grupo C-PLAC apresentaram valores significativamente elevados de creatinina, revelando prejuízos à função renal. As três doses de NAC administradas, foram capazes de reduzir esses valores;

7 - Os animais do grupo C-PLAC e C-NAC10 apresentaram valores significativamente elevados de CK e CK-MB, revelando prejuízos aos tecidos muscular e cardíaco. As doses de 300 e 100mg/kg de NAC influenciaram positivamente esses resultados para CK e Ck-MB, respectivamente;

8 - Os níveis de LPO em homogeneizado de VD indicado pelo teste de TBARS se mostraram elevados nos animais tratados com MCT, sendo que as diferentes doses

de NAC administradas não foram capazes de reduzir significativamente estes valores;

9 - Os animais do grupo C-PLAC e C-NAC10 apresentaram aumento significativo nos níveis de SOD revelando desequilíbrio redox. As doses de 100 e 300mg de NAC foram capazes de reduzir positivamente esses resultados;

10 - Os animais tratados com MCT apresentaram aumento significativo nos níveis de CAT, revelando desequilíbrio redox. As doses de 10 e 100mg de NAC foram capazes de reverter esses resultados;

11 - A MCT induziu no modelo experimental adotado lesões histopatológicas no tecido hepático. As diferentes doses de NAC administradas não reduziram o número e a frequência das lesões;

12 - A MCT na dose única de 60mg/kg não induziu lesão histopatológica no tecido renal em nenhum dos grupos experimentais;

13 - A MCT neste modelo experimental foi capaz de induzir lesões histopatológicas no tecido cardíaco, tanto atriais como ventriculares, sendo mais evidente nas câmaras direitas. A dose de 300mg de NAC foi capaz de reduzir o número e a frequência das lesões no ventrículo esquerdo;

14 - A injeção única de MCT (60mg/kg) foi capaz de produzir hipertrofia do ventrículo direito nos animais induzidos. A dose de 300mg de NAC parece ser capaz de reduzir esse efeito.

6. CONCLUSÕES

1 - O protocolo experimental utilizado nesse estudo foi capaz de reproduzir *Cor pulmonale* em ratos por meio da administração de MCT (60mg/kg), confirmado pelo conjunto de resultados obtidos nesse estudo, tais como sinais de ICD, redução do apetite, perda de peso, dano oxidativo, desequilíbrio redox e hipertrofia do VD;

2 - As doses mais elevadas de NAC (100 e 300mg/kg) revelaram melhores resultados com relação aos parâmetros de ganho de peso, bioquímica sérica, desequilíbrio redox, histopatologia cardíaca e hipertrofia do VD, sugerindo melhora na função hemodinâmica e redução no quadro de estresse oxidativo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v.105, p.121 – 6, 1984.

AFONSO, V. et al. A. Reactive oxygen Species and Superoxide Dismutase: Role in Joint Diseases. **Joint Bone Spine**, v.74, p.324-329, 2007.

AIELLO, S. E. **Manual Merck de Veterinária**. 8^a ed. São Paulo. Ed. Rocca Ltda, 1861p, 2001.

AKTAS, M. et al. Creatine kinase in dog plasma: preanalytical factors of variation, reference values and diagnostic significance. **Res. Vet. Sci.** v.56, p.30-36, 1994.

AKTA, M. et al. Disposition of creatine kinase activity in dog plasma following intravenous and intramuscular injection of skeletal muscle homogenates. **J. Vet. Pharmacol Ther**, v.18, p.1-6, 1995.

ALMEIDA, H. O. et al. Utilização do Picro-sírius para corar o *Paracoccidioides brasiliensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.21(2), p.55-58, 1988.

ALLEN, D.G.; MACKIN, A. *Cor pulmonale*. In: **Manual de Cardiologia para Cães e Gatos**, 3^a edição, Editores: L.P. Tilley e J.K. Goodwin, Roca, São Paulo: p.185-202, 2002.

AMARAL, A. S. AMARAL, A. S.; GASPAR, L. F. J.; HENNEMANN, C. R. A.. Valores de Referência de Constituintes Bioquímicos Séricos para Cães da Região De Santa Maria, RS. **Revista da FZVA Uruguaiana**, v. 2/3, n. 1, p.86-97, 1996.

ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. Animais de laboratório: criação e experimentação, Fiocruz, 388p., 2006.

ANDREAZZA, A. C.; SOARES, D. G.; KEHL, L. F.; LIMA-BORELLA, M. L.; SALVADOR, M. Transtornos Neuropsiquiátricos e Estresse Oxidativo. In: Izquierdo,

I. et al. **Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos**, Porto Alegre, Artmed, p.489-496, 2004.

ANRAKU, M. et al. Antioxidant protection of human sérum albumin by chitosan. **Int J of Bio Macromol**, v.43, p.159-164, 2008.

ARCHER, O.; RICH, S. Primary Pulmonary Hypertension a Vascular Biology and Translational Research “Work in Progress”. **Circulation**, v.102, n.22, p.2781-91, 2000.

ATKINSON, M.C. The use of N-acetylcysteine in Intensive Care. **Crit. Care Resusc.**, v.4, p.21-27, 2002.

ATKURI, K.R. et al. N-acetylcysteine – a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. **Current Opinion in Pharmacology – ScienceDirect**, v.7, p.355-359, 2007.

BARROS, C. S. L. Fígado, vias biliares e pâncreas exócrino. In: SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. (Eds). **Patologia veterinária**. São Paulo: Roca, p.183-290, 2014.

BELERENIAN, G. et al. Afecções **Cardiovasculares em Pequenos Animais**. 1ª ed: Interbook, p.218-225, 2003.

BELERENIAN, G. et al. **Afecciones Cardiovasculares in Pequenos Animales**. 2da Edición. Rio de Janeiro: Intermédica, 656p., 2007.

BERNOCCHI, P. et al. Skeletal muscle metabolismo in experimental heart failure. **J Mol Cell Cardiol**, v28, p.2263-2273, 1996.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n.2, Campinas, 1999.

BLOKHINA, O. et al. Antioxidants Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review. **Annals of Botany**, v.91, p.179-194, 2003.

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

BONANOMI, L.; GAZZANIGA, A. Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine. **Eur J. Respir. Dis Suppl**, v.111, p.45-51, 1980.

BOWLER, R.P. et al.; Role of Extracelular Superoxide Desmutase in Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v.282, n.4, p.719-726, 2002.

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

BRAUNWALD, E. Heart Disease. **A text book of cardiovascular medicine**. Pennsylvania (USA), 5 ed. W. B. Saunders Company, 1997.

BRIDGEMAN, M. M. E. et al. Cysteine and glutathione concentrations in plasma and bronchoalveolar lavage fluid after treatment with N-acetylcysteine. **Thorax**, v.46, p.39-42, 1991.

BULCKE, J. A.; SHERWIN, A. L. Organ specificity of creatine phosphokinase muscle isoenzyme. **Immunochemistry**, v.6, p.681, 1969.

CAMPBELL, A.L. et al.; Cell-based Gene Transfer of Vascular Endothelial Growth Factor Attenuates Monocrotaline-induced Pulmonary Hypertension. **Circulation**, v.104, p.2242-2248, 2001.

CAMPLESI, A. C. et al. Dosagem de marcadores cardíacos CK-MB e Tnlc e eletrólitos no envenenamento experimental por veneno de sapo em cães. **Pesq Vet Bras**, Rio de Janeiro, v.29, n.8, 2009.

CAVALCANTE, A.G.M.; BRUIN, P.F.C. O Papel do Estresse Oxidativo na DPOC: Conceitos Atuais e Perspectivas. **J. Bras. de Pneumologia**, v.35, ed. 12, 2009.

CENTER, S. A. et al. O Fígado e o Pâncreas. *In: HOSKINS, J. D. (ed) **Pediatria Veterinária: Cães e Gatos até Seis Meses de Idade***. São Paulo: Ed. Manole, p. 223-227, 1993.

CHAOUAT, A., et al. Pulmonary hypertension in COPD. **Eur Respir J.** v,32(5), p.1371-85. 2008.

CHAUMAIS MC.; RANCHOUX B.; MONTANI D.; DORFMULLER P.; TU L.; LECERF F.; RAYMOND N.; GUIGNABERT C.; PRICE L.; SMONNEAU G.; COHEN-KAMINSKY S.; HUMBERT M.; PERROS F. N-acetylcysteine improves established monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **Respiratory Research**. p.15:65, 2014

CHEN, L. et al. Attenuation of compensatory right ventricular hypertrophy and heart failure following monocrotaline-induced pulmonary vascular injury by the Na-H exchange inhibitor cariporide. **J Pharmacol and Experimental Therapeutics**, v.298 (2), p.469-476, 2001.

CHENG, W. et al.; Excess L-arginine Restores Endothelium-dependent Relaxation Impaired by Monocrotaline Pyrrole. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.207, p.187-194, 2005.

COGGINS, M. P.; BLOCH, K. D. Nitric Oxide in the Pulmonary Vasculature. **Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.**, v.27, p.1877-85, 2007.

COLES, E. H. **Veterinary Clinical Pathology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 267p., 1986.

COMINI, L. et al.; Aorta and Skeletal Muscle NO Synthase Expression in Experimental Heart Failure. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v.28, p.2241-2248, 1996.

COSTA, E. et al. Nitric oxide and bronquial asthma – review. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol**, v.22(3), p.83-93, 1999.

COTGREAVE, I. A. N-Acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. In: **Advances in Pharmacology**, vol 38: Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy. Edited by Sies H. Academic Press Inc.; p.205-227, 1997.

CSISZAR, A. LABINSKY, N.; OLSON, S. Resveratrol prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **Hypertension**, v.54, p.668-675, 2009.

CULLEN, J. M. Fígado, sistema biliar e pâncreas exócrino. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (Eds). **Bases da patologia em veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.393-461, 2009.

DAICHO, T. et al. Possible involvement of mitochondrial energy-producing ability in the development of right ventricular failure in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. **J. Pharmacol Sci.**, v.111(1), p.33-43, 2009.

DANTAS, J.A. et al. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Sci. Health Sci.**, v.28(2), p.165-170, 2006.

DAWSON, D. M.; FINE, I. H. Creatine kinase in human tissues. **Arch Neural**, v.16, p.175-80, 1967.

DECRAMER, M. et al. The Bronchitis Randomized on NAC Cost- Utility Study (BRONCUS): Hypothesis and Design. **Bronchus-trial Committee - Eur. Respir. J.**, v.17, n.3, p. 329-336, 2001.

DECRAMER, M. et al. Effects of N-acetylcysteine on Outcomes in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (Bronchitis Randomized on NAC Cost-Utility Study, BRONCHUS): A Randomized Placebo Controlled Trial. **Lancet**, v.365, n.9470, p.1552-1560, 2005.

DELANTY, N.; DICHTER, M.A. Antioxidant Therapy in Neurologic Disease. **Arch. Neurol.**, v.57, p.1265-1270, 2000.

DEL VECCHIO, L. et al. What we know about oxidative stress in patients with chronic kidney disease on dialysis-clinical effects, potential treatment and preservation. **Semin Dial**, v.24, p.56-64, 2011.

DEMARCO, V. G. et al. Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. **World J. Cardiol.**, v.26, 2(10), p.316-324, 2010.

DE ROSA, S. C. et al. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. **Eur J Clin Invest**, v.30, p.915-929, 2000.

DINIZ, P. P. V. P. et al. Cardiac trauma confirmed by cardiac markers in dogs: Two cases reports. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, p.85-89, 2007.

DOURADO, V.Z. TANNI, S.E.; VALE, S.A.; FAGANELLO, M.M.; SANCHEZ, F.F.; GODOY, I. Sistemic Manifestations in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **J. Bras. de Pneumologia**, v.32, n.2, p.161-71, 2006.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v.186, p.421-431, 1990.

ECARNOT-LAUBRIET, A. et al. Stage-dependent activation of cell cycle and apoptosis mechanisms in the right ventricle by pressure overload. **Biochem Biophys Acta**, v.24, 1586(3), p.233-242, 2003.

EVANS, T. W. Review article: albumin as a drug: biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v.16(8), p.6-11, 2002.

EPPENBERGER, H. M. et al. The comparative enzymology of creatine kinases. Isolation and characterization from chicken and rabbit tissues. **J Biol Chem**, v.242, p.204-209, 1967.

FARAHMAND, F. et al. Antioxidant and Oxidative Stress Changes in Experimental *Cor pulmonale*. **Mol. Cell. Biochem.**, v.260, p. 21-29, 2004.

FASCETTI, A. J. et al. Correlation between serum creatine kinase activities and anorexia in cats . **J. Vet. Intern. Med.**, v.11, p.9-13, 1997.

FEOLI, A.M.; SIQUEIRA, I.; ALMEIDA, L.M.; TRAMONTINA, A.C.; BATTU, C.; WOFCHUK, S.T.; GOTTFRIED, C.; PERRY, M.L.; GONÇALVES, C.A. Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to pre- and postnatal protein malnutrition. **J. Nutr**, v.136, p.2357–2361, 2006.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: Conceitos, Doenças Relacionadas, sistema de Defesa e Estresse Oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n.1, 1997.

FOLKERTS, G. et al. Reactive Nitrogen and Oxygen Species in Airway Inflammation. **European Journal of Pharmacology**, p. 251-262, 2001.

FOLTZ W.V.; WAGNER M.; RUDAKOVA E.; VOLK T. N-acetylcysteine prevents electrical remodeling and attenuates cellular hypertrophy in epicardial myocytes of rates with ascending aortic stenosis. **Basic Res Cardiol**, p.107:290, 2012.

FRIDOVICH, I. Oxygen Toxicity: A Radical Explanation. **The Journal of Experimental Biology**, v.201, p.1203-1209; 1998.

GALLOWAY, T.; HANDY, R. Immunotoxicity of Organophosphorous Pesticides. **Ecotoxicology**, v.12, p.345-363, 2003.

GEY, K.F. Vitamins E Plus C and Interacting Conutrients Required for Optimal Health. **Biofactors**, Oxford, v.7, n.1 e 2, p.113-174, 1998.

GRAUER, G. F. Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria and treatment. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v.46(10), p.469-478, 2005.

GRIFFITH, O.W.; MEISTER, A. Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. **Proc Natl Acad Sci**, USA, v.76, p.5606-5610, 1979.

GUERRA, J.I.E. Estrés Oxidativo, Enfermedades Y Tratamientos Antioxidantes. **An. Med. Interna (Madrid)**, v.18, n.6, 2001.

GUY, P. S.; SNOW, D. H. Skeletal muscle fibre composition in the dog and its relationship to athletic ability. **Rev Vet Sci**, v.31, p.244-248, 1981.

HALLIWELL, B. Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. **J. Neurochem.**, v.59, p.1609-1623, 1992.

HALLIWELL, B. et al. The Characterization on Antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annu Rev Nutr**, v.16, p.33-50, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd, **Oxford University Press Inc.**, New York, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine, 4rd, Oxford: **Oxford University Press**, 2007.

HART, M.C. Nitric Oxide in Adult Lung Disease. **Chest**, v.115, p.1407-1417, 1999.

HEGEWALD, M. J. et al. Pulmonary hypertension, clinical manifestations, classification and diagnosis. **International Journal Clinical Practice**, v.61, n.156, p.5-14, 2007.

HERCBERG, S. et al. Background and Rationale Behind the SU. VI. Max Study a Prevention Trial Using Nutritional Doses of a Combination of Antioxidant Vitamins and Minerals to Reduce Cardiovascular Diseases and Cancers. **International Journal for Vitamins and Nutrition Research**, Bern, v.68, p. 3-20, 1998.

HILL, N. S. et al. Supplemental oxygen reduces right ventricular hypertrophy in monocrotaline-injected rats. **J Appl Physiol**, v.66(4), p.1642-1648, 1989.

HILL, M. F.; SINGAL, P. K. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. **Am J Pathol**, v.148(1), p.291-293, 1996.

HOLDINESS, M.R. Clinical Pharmacokinetics of N-acetylcysteine. *Clin Pharmacokinet*, v.20, p.123-134, 1991.

HUBSCHER, G. H. Modulação da Hipertensão Pulmonar induzida por Monocrotalina através da Administração de Suco de Uva e Vinho Tinto. **Tese/doutorado/Centro de Ciências Biológicas: Fisiologia – UFRGS**, 2005.

JASMIN, J.F.; CERNACEK, P.; DUPIUS. Activation of the Right Ventricular Endothelin (ET) System in the Monocrotaline Model of Pulmonary Hypertension: Response to Chronic ETA Receptor Blokade. **Clinical Science**, v,105, p.647-653, 2003.

JONES, T. C. et al. **Patologia Veterinária**, 6.ed., São Paulo: Manole, 1424p., 2000.

JONES, J. E. et al. Serial noninvasive assessment of progressive pulmonary hypertension in a rat model. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.283, p.H364-371, 2002.

JONES, C. M. et al. Kinetics of superoxide scavenging by glutathione: an evaluation of its role in the removal of mitochondrial superoxide. **Biochem Soc Trans.**, v.31, p.1337-1339, 2003.

JONG, J.W. et al. Enhanced Expression and Activity of Xantine Oxidoreductase in the Failing Heart. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v.32, p.2083-2089, 2000.

KAMEZAKI, F. et al. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase ameliorates pulmonary hypertension in rats. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.177, p.219-226, 2008.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6.ed. San Diego: Academic, 916p., 2008.

KARAJIBANI, M. et al. Effect of vitamin E and C supplements on antioxidant defense system in cardiovascular disease patients in Zahedan, Southeast Iran. **J Nutr Sci Vitaminol**, v.56(6), p.436-440, 2010.

KELLUM, H. B., STEPIEN, R.L. Sildenafil citrate therapy in 22 dogs with pulmonary hypertension. **J. Vet. Inter. Med.**, v.21, p.1258-1264, 2007.

KELLY, G. S. Clinical Applications os N-acetylcysteine. **Alt Med Rev**, v.3(2), p.114-127, 1998.

KLEWINVELD, H.A.; DEMACKER, P. N. M.; STALENHOF, A. P. H. Failure of N-acetylcysteine to reduce low-density lipoprotein oxidizability in healthy subjects. **Eur J Clin Pharmacol**, v.43, p.639-642, 1992.

KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. **J. Biol. Chem.**, v.257, p.5751-5754, 1982.

LAURENT, T. et al. Oxidante-antioxidant balance in granulocytes during ARDS: effect of N-acetylcysteine. **Chest**, v.09(1), p.163-166, 1996.

LEFER, D.J.; GRANGER, D.N. Oxidative Stress and Cardiac Disease. **The American Journal of Medicine**, v.109, p.315-323, 2000.

LEINEWEBER, K. et al. Chamber-specific alterations of noradrenaline uptake (uptake 1) in right ventricles of monocrotaline-treated rats. **British J Pharmacol**, v.131, p.1438-1444, 2000.

LINDENA, J. et al. Effects of transient hypoxia in skeletal muscle on enzyme activities in lymph on plasma. **J Clin Chem Clin Biochem**, v.20, p.95-102, 1982.

LOPES, S.T.A. et al. Determinação da creatina quinase em cães. **Revista da FZVA**, v.12(1), p.116-122, 2005.

LUDKE, A.R.L. Avaliação da Administração de Suco de Uva em Modelo Experimental de Hipertensão Pulmonar – Papel do Óxido Nítrico e Estresse Oxidativo. **Dissertação/mestrado/Centro de Ciências Biológicas – Fisiologia da UFRGS**, Porto Alegre, 2007. p. 126.

LUDKE, A. R.; MOSELE, F.; CARON-LIENERT, R.; RIBEIRO, M. F.; PARTATO, W.; LIESUY, S.; ARAÚJO, A. S.; SINGAL, P.; BELLÓ-KLEIN, A. et al. Modulation of monocrotaline-induced *Cor pulmonale* by grape juice. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.55(1), p.89-95, 2010.

MACNEE, W. The clinical importance of right ventricular function in pulmonary hypertension, In: Weir EK; Archer SL & Reeves JT, eds. **The diagnosis and treatment of pulmonary hypertension**. Futura, New York, p. 13-40, 1992.

MARUYAMA, H. et al. Granulocyte colony-stimulating factor prevents progression of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. **Circ J.**, v.71(1), p.138-143, 2007.

MATHEW, R. et al. Role of inhibition of nitric oxide production in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Appl Physiol**, v.82(5), p.1493-1498, 1997.

MEDWAY, W. et al. **Patologia Clínica Veterinária**. México: Union Tipográfica Editorial Hispano-Americano, 532p., 1973.

MERELLES, D. et al. – Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. **Circulation** v.114 (14), p.1482-9. 2006.

MEYER, D. J. et al. **Medicina de Laboratório Veterinária – Interpretação e Diagnóstico**. São Paulo: Editora Roca, 308p., 1995.

MEYRICK, B. et al. Development of Crotalaria Pulmonary Hypertension Hemodynamic and Estructural Study. **Am. J. Physiol.**, v.239 (Heart Circ. Physiol. 8): p.H692-702, 1980.

MELO, M. M. et al. Intoxicação experimental com extratos de Mascagnia rígida (Malpighiaceae) em camundongos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60(3), p.631-640,2008.

MELO, M. G. D. et al. Valores de referencia hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v.8(4), p.1-6, 2012.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J. Biol. Chem**, v.247, p.3170 - 3175, 1972.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica: Princípio e Interpretação**. Porto Alegre: Ed. Médica Missou, p.234-246, 2000.

NELSON, S.K. et al. The Induction of Human Superoxide Dismutase and Catalase in Vivo: A Fundamentally New Approach to Antioxidant Therapy. **Free Radic. Biol. Med.**, v.40, p.341-347, 2006.

NEWMAN, S. J. et al. Sistema urinário. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (Eds). **Bases da patologia em veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.613-691, 2009.

NOSZAL, B. et al. Population, acid–base, and redox properties of N-acetylcysteine conformers. **J Med Chem**, v.43, p.2176-2182, 2000.

OCARINO, N. M. et al. Sistema cardiovascular. In: SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. (Eds). **Patologia veterinária**. São Paulo: Roca, p.51-88, 2014.

OLIVEIRA, S. T.; Alterações de Compostos Nitrogenados Não-Proteicos em Cães e Gatos: http://www6.ufrgs.br/bioquímica/posgrad/TMAD/alterações_nnp.pdf. Acesso em: 27 ago. 2007, 22:30.

ORTOLANI, O. et al. Protective Effects of N-acetylcysteine and Rutin on the Lipid Peroxidation of the Lung Epithelium During the Adult Respiratory Distress Syndrome. **Shock**, v.13, p.14-8, 2000.

OTA, J. S., PEREIRA, C. A. C. *Cor pulmonale*: **Medicina, Ribeirão Preto. Online**, cap. IV, v.31, p.241-246, 1998.

PAHAN, K. et al. N-acetylcysteine Inhibits Induction of no Production by Endotoxin or Cytokine Stimulated Rat Peritoneal Macrophages, C6 Glial Cells and Astrocytes. **Free Radical Biol. Med.**, v.24, p.39-48, 1998.

PAN, L.C. et al. *Cor pulmonale* is Caused by Monocrotaline and Dihydrimonocrotaline, but not by glutathione or cysteine conjugates of dihydropyrrolizine. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.118, p.87-97, 1993.

PANDEY, N.R.; KAM G.; CHANDRA M.; SANWAL G.G.; MISRA M.K. Enzymatic oxidant and antioxidants of human blood platelets in unstable angina and myocardial infarction. **Int. J. Cardiol**, v.76, p.33-38, 2000.

PICADA, J.N. et al. O Estresse Oxidativo e as Defesas Antioxidantes. **Genética Toxicológica**, p.251-267, 2003.

PICHARDO, J.; et al. Myocardial oxidative stress changes during compensated right heart failure in rats. **Mol. Cell. Biochem.**, v.196 (1-2), p.51-7, 1999.

POSSAMAI, F.P. Estudo do Estresse Oxidativo em Órgãos de Ratos Wistar Adultos Induzidos à Intoxicação por Malation. **Dissertação/mestrado/Centro de Ciências Ambientais da Universidade do Extremo Sul Catarinense**, Criciúma, p.57, 2005.

POULSEN, H.E. et al. Role of Oxidative DNA Damage in Cancer Initiation and Promotion. **European Journal of Cancer Prevention**, Oxford, v.7, n.1, p. 9-16, 1998.

PRESCOTT, L. Oral or intravenous N-acetylcysteine for acetaminophen poisoning? **Ann Emerg Med**, v.45, p.409-413, 2005.

PRYOR, W.A. Oxidatives Stress Status. **The Second Set Free Radic. Biol. Med.**, v.28, p.503-504, 2000.

RAHMAN, I.; MACNEE, W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. **Eur Respir J**, v.16, p.534-554, 2000.

REDOUT, E.M. et al. Antioxidant treatment attenuates pulmonary arterial hypertension induced heart failure. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.298, p. 1038-1047, 2010.

RHOADES, R. A. et al. Reactive oxygen species alter contractile properties of pulmonary arterial smooth muscle. **Can J Physiol Pharmacol**, v.68(12), p.1581-1589, 1990.

RICACHINEVSKY, C. P., AMANTÉA, S. L. Manejo farmacológico da hipertensão arterial pulmonar. Artigo de revisão. **Jornal de Pediatria**, v. 82 (5 Supl): S153 – 65, 2006.

RICH, S., Primary Pulmonary Hypertension. **Executive Summary from the World Symposium**, France, 1998. <http://www.who.int/ncd/cvd/pph-htm>.

RICH, S. et al. Anorexigens and Pulmonary Hypertension in the United States: Results from the Surveillance of North American Pulmonary Hypertension. **Chest**, v.117, n.3, p. 870-874, 2000.

RITTER, C. et al. Treatment with N-acetylcysteine Plus Deferoxamine Protects Rats Against Oxidative Stress and Improves Survival in Sepsis. **Critical Care Medicine**, v.32, n.2, p.342-349, 2004.

RITTER, C. Estresse Oxidativo e Desenvolvimento de Doenças Inflamatórias Agudas: Possível Papel Terapêutico de Antioxidantes. Tese/Doutorado/**Centro de Ciências Biológicas – Fisiologia da UFRGS**, p. 98, 2007.

ROCHA, G. Stress Oxidativo na Lesão pulmonar Neonatal. Artigo de Revisão. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. XIV, n.1, p.113-126, 2008.

RODRIGUES, R. **Enzimas de uso na clínica veterinária**; http://www6.ufrgs.br/bioquímica/posgrad/BTA/enzimas_vet.pdf, página mantida pela UFRGS. Acesso em: 25 mai. 2014, 14:00h.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant Defense Systems and Oxidative Stress. In Vigo Pelfrey, C.: Membrane Lipid Oxidation. 1^a ed, **Boca Raton, CRC Press**, p.151-170, 1991.

RUBIN, L.J. Diagnosis and Management of Pulmonary Arterial Hypertension: ACCP Evidence-based Clinical Practice Guidelines. **Chest**, v.126, Suppl 1, p.7S-10S, 2004.

SANTOS, V.P. Variações hemato-bioquímicas de em equinos de salto submetidos a diferentes tipos de protocolos de exercício. **Dissertação/Mestrado/Ciências Veterinárias: FMVZ da UFRGS**, p.94, 2005

SARNSTRAND, B. et al. N,N0-Diacetyl-L-cystine—the disulfide dimer of N-acetylcysteine — is a potent modulator of contact sensitivity/delayed type hypersensitivity reactions in rodents. **J Pharmacol Exp Ther**, v.288, p.1174-1184, 1999.

SAVRANSKY, V.; REINK, C.; JUN, J.; BEVANS-FONTI, S.; NAVAYAKKARA, A.; LI, J.; MYERS, A.C.; TORBENSON, M.S.; POLOTSKY, V.Y. Chronic intermittent hypoxia and acetaminophen induce synergistic liver injury. **Exp Physiol**, v.94(2), p.228-239, 2009.

SCHAFER, F. Q.; BUETHER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic. Biol. Med.**, v.1:30(11), p.1191-1212, 2001.

SCHERMULY, R. T. et al. Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **Am J Respir Crit Care Med**, v.169, p.39-45, 2004.

SERAKIDES, R. Sistema urinário. In: SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. (Eds). **Patologia veterinária**. São Paulo: Roca, p.291-336, 2014.

SEYFART, T. et al. The Cardiac β – adrenoceptor-G-protein (s)-adenyl cyclase System in Monocrotaline Treated Rats. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v.32, p.2315-26, 2000.

SIETSEMA, K. Cardiovascular limitations in chronic pulmonary disease. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 33, n.7, suppl. p.S656 – s661, 2001.

SILVA, E.C. Avaliação do Estresse Oxidativo em Adolescentes com Asma e Rinite. **Dissertação/mestrado/Centro de Ciências da Saúde – Universidade do Extremo Sul Catarinense**, Criciúma, 2008.

SILVA, F. L. Adaptação Oxidativa e Funcional Progressiva do Sistema Cardiopulmonar Secundária à Hipertensão Arterial Pulmonar em Ratos. **Tese/doutorado/Centro de Ciências Biológicas: Fisiologia – UFRGS**, p.89, 2011.

SIMONNEAU, G., et al. Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v.54 (1 Suppl S), p.S43 – 54, 2009.

SINGAL, K.P.; KHAPER, N.; BILLÓ-KLEIN, A.; BHAYANA, M.. Oxidative Stress Status in the Transition of Hypertrophy to Heart Failure. **Heart. Fail. Rev.**, v.4, p.353-360, 1999.

SIQUEIRA, R. A influência do Estrogênio na Hipertensão Arterial Pulmonar: Papel do Estresse Oxidativo. **Dissertação/mestrado/Centro de Ciências Biológicas: Fisiologia – UFRGS**, p.67, 2011.

SOBEL, B. E. et al. The nature of disappearance of creatine kinase from the circulation and its influence enzymatic estimation of infarct size. **Circ Res**, v.41, p.836-844, 1977.

SOTO-BLANCO, B. et al. Lack of protective action of cysteine against the fetotoxic effect of monocrotaline. **Food and Chemical Toxicology**, v.39, p.635-639, 2001.

SOUZA-RABBO, M.P. Efeitos do Treinamento Físico no Perfil Hemodinâmico e no Estresse Oxidativo em Modelo Experimental de *Cor pulmonale*. **Tese/doutorado/Centro de Ciências Biológicas – Fisiologia da UFRGS**, Porto Alegre, 59p., 2005.

SOUZA-RABBO, M. P; SILVA, L. F.; AUZANI, J. A.; PICORAL, M.; KHAPER, N.; BELLÓ-KLEIN, A. Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.35 (8), p.944-948, 2008.

SPAPEN, H. et al. Does N-acetyl-L-cysteine Influence Cytokine Response During Early Human Septic Shock? **Chest**, v.113, p.1616-1624, 1998.

SPRONG, R.C. et al. Low-dose N-acetylcysteine Protects Rat Against Endotoxin-mediated Oxidative Stress but High-dose Increases Mortality. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.157, p.1283-1293, 1998.

STEPNIEWSKA J. et al. Prooxidative-Antioxidante Balance of Cells in Different Types of Renal Replacement Therapy. **Blood Purification**, v.37, p.4-11, 2014.

TEPEL, M. et al. Prevention of Radiographic Contrast Agent Induced Reductions in Renal Function By Acetylcysteine. **N. Engl. J. Med.**, v.343, p.180-184, 2000.

TERRACIO, L.; THOMAS, K.B. Factors Affecting Cardiac Cell Shape. **Heart Fail.**, v.4, n. 4 e 5, 1998.

TERUYA, R. Estudo de aspectos morfológicos e funcionais do rim de ratos submetidos à isquemia e reperfusão de músculo esquelético, sob ação da pentoxifilina. **Tese/doutorado/Centro de Ciências: Universidade Federal de São Paulo: São Paulo, 2006.**

THONSON, R. E. **Patologia Veterinária Especial.** Editora Manole, São Paulo, 753p., 1990.

THORSTENSSON, A. et al. Effect of strength training on enzyme activities and fibre characteristics in human skeletal muscle. **Acta Physiol Scand**, v.96, p.392-398, 1976.

TOMBE, P.P. Contractile Function in Heart Failure. **Cardiovascular. Res.**, v.37, p.367-380, 1998.

TORRES, R.L. Impacto do Estresse Oxidativo em Diferentes Eventos Envolvidos no Transplante Pulmonar em Ratos. **Tese/doutorado/Faculdade de Medicina – Pneumologia da UFRGS, Porto Alegre, p. 84, 2005.**

URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative Stress Exercises and Antioxidant Supplementation. **Toxicology**, v.189, p.41-54, 2003.

VALBERG, S. J.; HAGGENDAL, J.; LINDHOLM, A. Muscle histopathology and plasma aspartate aminotransferase, creatine kinase and myoglobin changes with exercise in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. **Equine Vet J**, v.25(1), p.11-16, 1993.

VALLYATHAN, V.; SHI, X. The role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung diseases. **Environ Health Perspect**, v.105(1), p.165-177, 1997.

VALTSCHANOFF, J.G. et al. NADPH diaphorase in the spinal cord of rats. **J Comp Neurol**, v.321, p.209-222, 2010.

VAN DEN BRADEN, C. et al. Carvedilo Protects Against Glomerulosclerosis in Rat Remnant Kidney without General Changes in Antioxidant Enzyme Status. A Comparative Study of Two Beta-Blocking Drugs, Carvedilol and Propranolol. **Nepron**, v.77, p. 319-324, 1997.

VAN VLEET, J. F.; FERRANS, V. J. Sistema cardiovascular. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (Eds). **Bases da patologia em veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.559-612, 2009.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATOM, S.; KUBOTA, L.T. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos para sua Determinação. **Quim. Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

WAKATSUKI, T. et al. The Biochemical Response of the Heart to Hypertension and Exercise. **Trends. Bioch. Sci.** v.29, n.11, 2004.

WANG, YU-PING; YAN, J.; FU, P. P.; CHOW, M. W. Human liver microsomal reduction of pyrrolizidine alkaloid N-oxides to form the corresponding carcinogenic parent alkaloid. **Toxicology Letters**, v.155, p.411-420, 2005.

WOLKART, G. et al. Calcium Handling and Role of Endothelin-1 in Monocrotaline Right Ventricular Hypertrophy of the Rat. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v.32, p.1995-2005, 2000.

WILSON, D. W.; SEGALL, H. J. Changes in type II cells populations in monocrotaline toxicity. **Am. J. Pathol.**, v.136, p.1293-1299, 1989.

WILSON, D.W.; SEGALL, H.J.; PAN, L.C.; LAME, H.W.; ESTEP, J.E.; MORIN, D. Mechanisms and Pathology of Monocrotaline Pulmonary Toxicity. **Crit. Rev. Toxicol.** v.22, p.307-25, 1992

WOOD, L.G. et al. Biomarkers of Lipid Peroxidation Airway Inflammation and Asthma. **European Respiratory Journal**, p.177-186, 2003.

YAN, C. C.; HUXTABLE, R. J. Effects of monocrotaline a pyrrolizidine alkaloid on glutathione metabolism in the rat. **Biochemical Pharmacology**, v.51, p.375-379, 1996.

YE, Y. et al. Myocardial creatine kinase kinetics and isoform expression in hearts with severe LV hypertrophy . **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v.28, p.376 – 386, 2001.

YILDIZ, P. Molecular mechanisms of pulmonary hypertension. **Clin Chem Acta**, v.403(1-2), p.9-16. 2009.

YILMAZ, H.R., et al. The Effects of n-3 polyunsaturates Fatty Acids by Gavage on Some Metabolic Enzymes of Rat Liver. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v.71, p.131-135, 2004.

ZABKA, T. S. et al. Pulmonary arteriopathy and idiopathic pulmonary arterial hypertension in six dogs. **Veterinary Pathology**, v. 43, n.4, p.510-522, 2006.

ZAFARULLAH, M.; LI, W. Q.; SYLVESTER, J.; AHMAD, M. Molecular mechanisms of n-acetylcysteine actions. **Cell Mol. Life Sci.**, v.60, p.6-20, 2003.

ZOBAN, P.; CERNY, M. Immature Lung and Acute Lung Enjury. **Physiol. Res.**, v.52, p.507-516, 2003.

ZWART, L.L. et al. Biomarkers of the Free Radical Damage Applications in Experimental Animals and in Humans. **Free Radical Biology and Medicine**, v.26, p.202-226, 1999