



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Tese de Doutorado

**Potencial farmacológico do pterostilbeno sobre diferentes alvos
no remodelamento ventricular cardíaco: efeitos sobre o ventrículo
direito e esquerdo**

Autora: Denise dos Santos Lacerda

Orientador: Dr. Alex Sander da Rosa Araujo

Co-orientadora: Dra. Valquiria Linck Bassani

Porto Alegre, 2018.

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

Denise dos Santos Lacerda

**Potencial farmacológico do pterostilbeno sobre diferentes alvos
no remodelamento ventricular cardíaco: efeitos sobre o ventrículo
direito e esquerdo**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Dr. Alex Sander da Rosa Araujo
Co-orientadora: Dra. Valquiria Linck
Bassani

Porto Alegre, 2018.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta.”

Carl Sagan

Banca Examinadora

Prof. Dra Iraci Torres Lucena

Departamento de Farmacologia

ICBS - UFRGS

Prof. Dra Cristiane Matté

Departamento de Bioquímica

UFRGS

Prof. Dra. Maria Cláudia Irigoyen

Instituto do Coração-INCOR

USP

Agradecimentos

À **Deus**, por me amparar nos momentos difíceis, me dar saúde e força interior para superar as dificuldades.

Aos meus filhos **Wesley Lacerda Pinós** e **Andriw Lacerda Pinós**, e meu esposo, **Arlindo Antônio Pinós**, pelo amor, incentivo, apoio incondicional e por compreenderem os momentos de ausência necessários à minha formação.

Aos meus pais, irmãos, sobrinhos e cunhados pelo amor, incentivo.

Ao meu orientador, **Dr. Alex Sander da Rosa Araujo**, pela oportunidade, confiança, atenção e principalmente por compartilhar seus ensinamentos e experiências ao longo do desenvolvimento desta Tese.

À minha co-orientadora, **Dra. Valquiria Link Bassani**, por ter aceitado participar da construção deste trabalho, pela confiança a mim depositada, pelos ensinamentos e por ter disponibilizado o seu laboratório para a realização de alguns experimentos.

À **Dra. Adriane Belló-Klein** pelo incentivo, ensinamentos, pela receptividade e generosidade para comigo.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (UFRGS) pela amizade, companheirismo, esforço e dedicação a esse trabalho, em especial ao **Patrick Türck**, **Alexandre Hickmann** e **Cristina Campos**.

À **Sara Bianchi**, colega que foi fundamental para a realização deste trabalho. Obrigada pela amizade, incentivo e dedicação.

Aos demais professores do Programa de Pós Graduação de Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica – UFRGS.

Aos demais queridos amigos, pelo carinho e inesgotáveis palavras de incentivo.

Resumo

O estilbenoide pterostilbeno (PTS), um constituinte fenólico altamente lipofílico, vem se destacando devido ao seu potencial farmacológico evidenciado por seus efeitos antitumoral, antidiabético e anti-inflamatório, dentre outros, descritos tanto em estudos pré-clínicos quanto clínicos. O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade, determinar dose terapêutica, potencial antioxidante do pterostilbeno complexado à ciclodextrina (complexo PTS:HP β CD), bem como seu efeito sobre parâmetros funcionais e modulação de vias redox sensíveis no ventrículo direito e esquerdo de ratos com insuficiência cardíaca. O complexo PTS:HP β CD foi preparado por método em solução e caracterizado por calorimetria diferencial de exploratória (DSC), espectroscopia por infravermelho e por ressonância magnética nuclear. O teor de PTS no complexo foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Posteriormente, os efeitos farmacológicos do complexo, nas doses correspondentes a 25, 50 e 100 mg/kg de PTS, foram testadas sobre o estresse oxidativo e vias de sinalização redox sensíveis no tecido hepático (Experimento I), no ventrículo direito (VD) (Experimento II) e esquerdo (VE) (Experimento III). No experimento I, a fim de determinar toxicidade e identificar a dose terapêutica, foram avaliados no tecido hepático de ratos alguns parâmetros oxidativos de dano tecidual, nível de antioxidante não enzimático e a expressão de proteínas redox sensíveis como proteína cinase B (AKT) e glicogênio sintase cinase-3 β (GSK-3 β) após 14 dias da administração oral (gavage) do complexo PTS:HP β CD (25, 50 e 100 mg/kg/dia). A complexação demonstrou ser capaz de aumentar a solubilidade aparente da PTS tornando possível a administração da curva de dose, sem induzir dano hepático ou apoptose pelas doses administradas. Além disso, o complexo mostrou efeitos antioxidantes dose-dependentes no fígado dos ratos, evidenciados por uma redução na peroxidação lipídica e de espécies reativas de oxigênio, bem como por aumento no conteúdo de antioxidante não enzimático. O complexo PTS: HPBCD também aumentou a expressão de proteínas redox sensíveis, como AKT e GSK-3 β , relacionadas à via de sinalização da insulina no fígado. No experimento II, a mesma curva de dose (25, 50 e 100 mg/kg/dia) administrada 1x ao dia durante 14 dias, foi testada sobre as alterações inerentes ao remodelamento do VD induzido por hipertensão arterial pulmonar (*Cor pulmonale*), após a administração do alcaloide monocrotalina (MCT). Ao final do protocolo experimental, para avaliar a função cardíaca os animais foram submetidos ao cateterismo do VD e ecocardiografia. Os achados sugerem que complexo PTS:HP β CD,

de maneira dose-dependente, protege a função sistólica, previne a hipertrofia do VD, reduz a concentração de ânion superóxido dependente de NADPH oxidase, restaurou a atividade da superóxido dismutase (SOD) e glutationala peroxidase (GPx), além de reduzir a atividade da catalase (CAT). Adicionalmente, o complexo PTS: HPβCD aumentou o conteúdo de glutationala reduzida (GSH) e a razão glutationala reduzida/glutationala oxidada, e ainda restaurou a atividade da glutationala-S-transferase (GST) e glutaredoxina (GRx) no VD de ratos com *Cor pulmonale*. Além disso, em doses mais elevadas, também evitou a redução do volume sistólico e do débito cardíaco, reduziu a lipoperoxidação e aumentou a expressão da proteína SERCA no VD de ratos tratados com MCT. Por outro lado, no experimento III, foi testado o efeito do complexo PTS:HPBCD sobre o remodelamento do VE pós infarto agudo do miocárdio (IAM) em ratos. Neste protocolo experimental, o IAM foi produzido por meio da ligadura cirúrgica dos ramos anteriores descendentes da artéria coronária esquerda. Sete dias após o procedimento cirúrgico, o complexo PTS:HPβCD, na dose de 100 mg/kg/dia, foi diariamente administrado por via oral durante 8 dias. Os resultados mostraram que o complexo PBS:HPβCD diminuiu a peroxidação lipídica, preveniu a redução na atividade da tioredoxina redutase (TRxR) e aumentou a atividade da GST e da GRx. Além disso, a expressão do fator nuclear eritróide 2 (Nrf2) e p-GSK-3β foi aumentada, enquanto a relação GSK-3β fosforilada/total foi reduzida no VE dos animais infartados. Portanto, o conjunto de resultados da presente Tese destaca o papel antioxidante do complexo PTS:HPβCD em ratos, especialmente na dose de 100 mg/kg, e sua modulação sobre a expressão proteínas de sinalização redox sensíveis tanto no fígado quanto em ambos ventrículos sob condições de remodelamento patológico. As ações cardioprotetoras do complexo PTS:HPβCD parecem prevenir o remodelamento ventricular e melhoram a função sistólica direita e esquerda, efeitos que provavelmente foram favorecidos pelo aumento da biodisponibilidade oral promovido pela presença da HPβCD no complexo. Diante disso, o complexo PTS:HPβCD poderia ser usado como um tratamento complementar a terapia farmacológica disponível a fim de minimizar os efeitos deletérios do desbalanço oxidativo sobre a homeostase e função cardíaca.

Abstract

The stilbenoid pterostilbene (PTS), a highly lipophilic phenolic constituent, has been highlighted due to its pharmacological potential evidenced by its antitumor, antidiabetic and anti-inflammatory effects, among others described in both preclinical and clinical studies. The aim of this study was to evaluate toxicity, determine therapeutic dose and antioxidant potential of pterostilbene complexed to cyclodextrin (PTS:HP β CD), as well as its effect on functional parameters and modulation of sensitive redox pathways in the right and left ventricles of rats with heart failure. The PTS:HP β CD complex was prepared by solution method and characterized by differential scanning calorimetry (DSC), infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. The PTS content in the complex was quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). Subsequently, the pharmacological properties of the complex at doses corresponding to 25, 50 and 100 mg/kg of PTS were tested on oxidative stress and redox signaling pathways in the hepatic tissue (Experiment I) in the right ventricle (RV) (Experiment II) and left ventricle (LV) (Experiment III). Regarding Experiment I, in order to determine toxicity and to identify the therapeutic dose, oxidative parameters of tissue damage, non-enzymatic antioxidant levels and expression of Protein kinase B (AKT) and Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) sensitive redox proteins were evaluated in rat hepatic tissue after 14 days of the PTS:HP β CD complex (25, 50 and 100 mg/kg/day) oral administration (via gavage). Complexation has been shown to increase the apparent solubility of PTS without inducing hepatic damage or apoptosis at the doses administered. In addition, PTS:HP β CD complex showed dose-dependent antioxidant effects on rats liver, evidenced by a reduction in lipid peroxidation and reactive oxygen species, as well as by an increase in non-enzymatic antioxidant content. The PTS:HP β CD complex also increased the expression of sensitive redox proteins, such as AKT and GSK-3 β , related to insulin signaling pathway in the liver. In Experiment II, same doses (25, 50 and 100 mg/kg/day) of PTS:HP β CD were administered daily for 14 days and its effects were tested on the inherent RV remodeling triggered by pulmonary arterial hypertension (*Cor pulmonale*) after administration of the monocrotaline (MCT) alkaloid. At the end of the experimental protocol, animals were submitted to RV catheterization and echocardiography to evaluate cardiac function. The results suggest that the PTS:HP β CD complex, in a dose-dependent manner, protects systolic function, prevents RV hypertrophy, reduces NADPH oxidase-dependent superoxide anion concentration, and restores superoxide dismutase (SOD) and

glutathione peroxidase (GPx) activity, in addition to reducing catalase activity (CAT). Moreover, PTS:HP β CD complex increased reduced glutathione (GSH) content and reduced glutathione/oxidized glutathione ratio, recovering glutathione-S-transferase (GST) and glutaredoxin (GRx) activities in the RV of rats with *Cor pulmonale*. At higher doses, PTS:HP β CD also avoided reduction of systolic volume and cardiac output, reduced lipoperoxidation and increased expression of SERCA in the RV of MCT treated rats. On the other hand, in Experiment III, the effect of the PTS:HPBCD complex was tested on the LV remodeling after acute myocardial infarction (AMI) in rats. In this experimental protocol, AMI was triggered by surgical ligation of the descending anterior branches of left coronary artery. Seven days after the surgical procedure, 100 mg/kg/day of PTS:HP β CD complex were administered orally for 8 days. Results showed that the PTS:HP β CD decreased lipid peroxidation, prevented the reduction of thioredoxin reductase (TRxR) activity and increased GST and GRx activities. Furthermore, expression of erythroid nuclear factor 2 (Nrf2) and p-GSK-3 β was increased, while the phosphorylated/total GSK-3 β ratio was reduced in the LV of infarcted animals treated with the complex. Therefore, the set of results of the present thesis highlights the antioxidant role of the PTS:HP β CD complex in rats, especially at the dose of 100 mg/kg, and its modulation on the expression of sensitive redox signaling proteins in the liver and both ventricles under conditions of pathological remodeling. The cardioprotective actions of the PTS:HP β CD complex seem to prevent detrimental ventricular remodeling and improve right and left systolic function, effects that were probably favored by the increased oral bioavailability promoted by the presence of HP β CD in the complex. In view of the presented evidences, the PTS:HP β CD complex could be used as a complementary treatment to the available pharmacological therapy in order to minimize the deleterious effects of oxidative imbalance on homeostasis and cardiac function.

| | |
|--|------------|
| Resumo ----- | I |
| Abstract ----- | II |
| Lista de Abreviaturas ----- | III |
| Lista de Figuras ----- | IV |
| 1. Revisão da literatura ----- | 15 |
| 1.1 Pterostilbeno: aspectos farmacológicos----- | 15 |
| 1.2 Pterostilbeno: o impacto da hidrossolubilidade na biodisponibilidade --- | 17 |
| 1.3 Remodelamento ventricular e insuficiência cardíaca ----- | 19 |
| 1.4 Remodelamento ventricular: mecanismos fisiopatológicos ----- | 21 |
| 1.5 O impacto do estresse oxidativo no remodelamento ventricular----- | 23 |
| 2. Objetivos ----- | 28 |
| 2.1 Objetivos gerais ----- | 28 |
| 2.2 Objetivos específicos----- | 28 |
| 3. Abordagem Metodológica ----- | 30 |
| 3.1 Reagentes----- | 30 |
| 3.2 Preparo do complexo PTS:HP β CD----- | 30 |
| 3.3 Preparo da mistura física PTS:HP β CD----- | 30 |
| 3.4 Caracterização do complexo PTS:HP β CD----- | 30 |
| 3.4.1 Análise térmica----- | 30 |
| 3.4.2 Espectroscopia por infravermelho----- | 31 |
| 3.4.3 Espectroscopia por ressonância magnética nuclear----- | 31 |
| 3.4.4 Potencial antioxidante de captura radical total-TRAP----- | 31 |
| 3.5 Estudos <i>in vivo</i> ----- | 31 |
| 3.5.1 Animais----- | 31 |
| 3.5.2 Cálculo amostral ----- | 31 |
| 3.5.3 Desenho experimental----- | 32 |
| 3.5.3.1 Remodelamento do ventrículo direito: indução da hipertensão arterial pulmonar e demais procedimentos----- | 32 |
| 3.5.3.1 Remodelamento do ventrículo esquerdo: indução da hipertensão arterial pulmonar e demais procedimentos----- | 33 |
| 3.5.4 Morfometria e índice de hipertrofia ventricular----- | 34 |
| 3.5.5 Preparo do homogeneizado----- | 35 |
| 3.5.6 Ensaios bioquímicos----- | 35 |
| 3.5.7 Aspectos éticos----- | 36 |
| 4. Resultados ----- | 37 |
| 4.1 Capítulo I: artigo 1: Efeito do pterostilbeno complexado com ciclodextrina no fígado de ratos: potencial redução do estresse oxidativo e modulação de proteínas redox sensíveis----- | 38 |
| 4.2 Capítulo II: artigo 2: Pterostilbeno reduz estresse oxidativo, previne hipertrofia e preserva a função sistólica do ventrículo direito em modelo de <i>Cor pulmonale</i> ----- | 55 |
| 4.3 Capítulo III: artigo 3: Pterostilbeno melhora o volume sistólico e o débito cardíaco em um modelo rato com insuficiência cardíaca direita através da modulação de proteínas do manejo de cálcio e estresse oxidativo----- | 69 |
| 4.4 Capítulo VI: artigo 4: Estilbenoide pterostilbeno, complexado com ciclodextrina, preserva a função ventricular esquerda após infarto do | |

| | |
|---|------------|
| miocárdio em ratos: possível envolvimento de proteínas tios e modulação de GSK-3 β fosforilada----- | 106 |
| 5. Discussão geral----- | 120 |
| 6. Considerações finais----- | 126 |
| 7. Perspectivas----- | 126 |
| 8. Referências----- | 128 |
| 9. Anexo----- | 142 |

Lista de figuras

Figura 1: Estrutura química do pterostilbeno. Extraído e adaptado de Pterostilbene Monograph 2010.

Figura 2: Desenho esquemático do complexo de inclusão PTS:HP β CD.

Figura 3: Potenciais alvos moleculares das EROs durante o remodelamento ventricular e insuficiência cardíaca. Adaptado de Tsutsui et al 2011. EROs: espécies reativas de oxigênio; MAPK: proteínas quinases ativadas por mitógenos; JNK: quinase c-Jun N-terminal; p-38: p-38 MAP-quinase; AKT: serina/treonina quinase; NF- κ B: fator nuclear kappa B; Ca²⁺ATPase: bomba de cálcio.

Figura 4: Potencial farmacológico do complexo PTS:HP β CD em diferentes alvos. AKT: serina/treonina quinase; CAT: catalase; EROs: espécies reativas de oxigênio; FAC: variação de área fracional; GSK-3 β : glicogênio sintase quinase 3 β ; GRx: glutaredoxina; GSH: reduzida da glutathiona; GSSG: glutathiona oxidada; GST: glutathiona-S-transferase; HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; IAM: infarto agudo do miocárdio; Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; SERCA: proteína cálcio ATPase; SOD: superóxido dismutase; TAPSE: excursão sistólica do plano do anel da tricúspide; TRxR: tiorredoxina redutase; VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo. \uparrow : aumento; \downarrow : redução.

Lista de abreviaturas

AKT: serina/treonina quinase

Ca²⁺: íon cálcio

CAT: catalase

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CoA: malonil coenzima A

COX2: ciclo-oxigenase-2

CTR: Controle

Cys-SOH: ânion tiolato, gerando a forma sulfênica

ERK1/2: quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2

ERNs: espécies reativas de nitrogênio

EROs: espécies reativas de oxigênio

FAC: variação da área fracional

GSK-3 β : glicogênio sintase quinase 3 β

GPx: glutationa peroxidase

Grx: glutaredoxina

GSH: reduzida da glutationa

GSSG: glutationa oxidada

GST: glutationa-S-transferase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HO-1: heme oxigenase-1

HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina

IAM: infarto agudo do miocárdio

IC: insuficiência cardíaca

ICD: insuficiência cardíaca direita (ICD)

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

JNK: quinase c-Jun N-terminal

Keap1: kelch-like ECH-associated protein-1

MAPK: proteínas quinases ativadas por mitógenos

MCT: monocrotalina

MMPs: metaloproteinases da matriz mitocondrial

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NF-κB: fator nuclear kappa

NO: óxido nítrico

Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2

O^{2•-}: ânion superóxido

•OH: radical hidroxil

ONOO⁻: peroxinitrito

p-38: p-38 MAP-quinase

PKA: proteína cinase A

PTS: pterostilbeno

RyR: receptor de rianodina

SOD: superóxido dismutase

TAPSE: excursão sistólica do plano do anel da tricúspide

TRx: tioredoxina

TRxR: tioredoxina redutase

VD: ventrículo direito

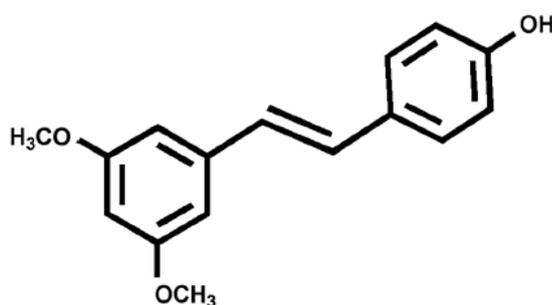
VE: ventrículo esquerdo

1. Revisão da literatura

1.1 Pterostilbeno: aspectos farmacológicos

O pterostilbeno (*trans*-3,5-dimethoxy-4'-hydroxystilbene,) é um constituinte fenólico encontrado numa ampla variedade de frutas, tais como mirtilo, uva, ameixa dentre outras (RIVIERE et al., 2012; RIMANDO et al., 2004). Biologicamente, o pterostilbeno (PTS) pode ser classificado como uma fitoalexina, por participar do sistema de defesa da planta. Este constituinte é sintetizado a partir de moléculas precursoras como malonil coenzima A (CoA) e p-cumaroil Coa catalisada pela enzima estilbeno sintetase, em resposta a infecções por patógenos (vírus, bactérias e fungos) ou por excessiva exposição à radiação ultravioleta (BAVARESCO et al., 1999).

Quimicamente, o PTS pertence ao grupo dos estilbenos, devido à presença de dois anéis benzenos ligados por uma porção de isopropileno (KASIOTIS et al., 2013), sendo estruturalmente análogo ao resveratrol. Contudo, diferencia-se deste por apresentar dois grupamentos metóxi e um grupo hidroxila (Figura 1), enquanto que o resveratrol possui três hidroxilas (LIN et al., 2009). A presença dos grupos metoxi na estrutura do pterostilbeno promove sua maior estabilidade metabólica, bem como aumenta sua lipofilia, resultando em melhores perfis farmacocinéticos, promovendo sua absorção intestinal, aumento da biodisponibilidade e potencial de penetração através das membranas teciduais (MCCOMARK; MCFADDEN 2012). Neste contexto, o PTS tem demonstrado farmacocinética mais favorável e superior potência farmacológica do que o resveratrol, mesmo quando administrado em doses menores (CHOO et al., 2014).



Fórmula Molecular: C₁₆H₁₆O₃

Peso molecular: 256.99 g/mol

Figura 1: Estrutura química do pterostilbeno. Extraído e adaptado de Pterostilbene Monograph 2010.

O PTS vem se destacando devido aos seus efeitos biológicos benéficos, recentemente descritos tanto em abordagens pré-clínicas quanto clínicas (WU et al., 2017; RICHE et al., 2014). O potencial farmacológico deste composto inclui os seguintes efeitos: antitumoral, uma vez que este constituinte fenólico estimula a sinalização de apoptose; anti-inflamatória, dada a sua inibição nas atividades COX2 e iNOS; antidiabética, devido à ação inibitória sobre gliconeogênese, e insulínica; assim como antioxidante (ACHARYA; GHASKADBI, 2013; LV et al., 2014; MCCORMACK; MCFADDEN, 2013); PARI; SATHEESH, 2006; PAUL et al., 2009). Os efeitos antioxidantes são atribuídos, em parte, a sua capacidade de neutralização e inibição da produção de espécies reativas, assim como ativação de sistemas antioxidantes endógenos (MCCORMACK; MCFADDEN, 2012). Adicionalmente, outro importante efeito citoprotetor do PTS está relacionado a ativação do nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), um fator de transcrição, regulador chave da resposta antioxidante. Esse mecanismo está relacionado à inibição da interação da proteína Kelch-like ECH-associated protein-1 (Keap1) com o Nrf2 (Keap1-Nrf2), com consequente a ativação de Nrf2, resultando em sua translocação para o núcleo e ativação transcricional de genes de antioxidantes de fase II e de agentes redutores como a glutatona (ELANGO et al., 2016). Esses efeitos despertam, cada vez mais, o interesse científico para a identificação de novos mecanismos de ação do PTS e o torna um candidato para utilização como alimento funcional ou composto farmacêutico terapêutico (KOSURU et al., 2016).

Nesse contexto, torna-se importante conhecer as características físico-químicas e farmacocinéticas do PTS, a fim de determinar a dose terapêutica, biodisponibilidade, perfil de distribuição, efeitos no tecido alvo e grau de toxicidade, fatores que desempenham um importante papel no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas e produtos terapêuticos (LIN et al., 1997; YEO et al., 2013). Evidências obtidas a partir de estudos farmacocinéticos pré-clínicos revelam que a absorção oral do PTS pode ser consideravelmente maximizada quando coadministrado durante ou logo após uma refeição, enquanto que no jejum sua biodisponibilidade é reduzida, sendo inferior a 5 % (YEO et al., 2013). Em relação a mecanismos de excreção, Remsberg e cols. sugerem que o PTS seja excretado predominantemente por meio de vias de eliminação não renal, já que a fração intacta excretada na urina foi inferior a 1% (REMSBERG et al., 2008). Recentes estudos evidenciaram que o PTS sofre metabolismo hepático de fase II, predominantemente metilação, glicuronidação e sulfatação, considerada sua principal via de eliminação (KAPETANOVIC et al., 2011; REMSBERG et al., 2008). As

concentrações de metabólitos plasmáticos de PTS (ambos conjugados com sulfato e glicuronídeos) foram substancialmente mais elevadas do que as concentrações plasmáticas do composto original (KAPETANOVIC et al., 2011). O PTS exibe uma farmacococinética não linear, ou seja, a velocidade de eliminação é constante independente da quantidade de composto presente (YEO et al., 2013). Assim, pequenas mudanças na dose resultam em mudanças desproporcionais nas concentrações do composto no sangue, sejam por concentrações obtidas após dose única ou múltiplas doses (SHARGEL; ANDREW, 1999). Neste contexto, a cinética de eliminação de PTS pode ser saturada, levando a uma maior exposição aos tecidos (CHOO et al., 2014; YEO et al., 2013).

Estudos que avaliem a segurança da administração terapêutica do PTS são escassos. Em roedores a administração intraperitoneal (30 mg/kg/dia) durante três semanas, não demonstrou toxicidade sistêmica ou tecidual (RUIZ et al., 2009). Em seres humanos, Riche de cols. (2013) não encontraram efeitos tóxicos ou reações adversas do PTS após a administração de doses de 250 mg/dia.

1.2 Pterostilbeno: o impacto da hidrossolubilidade na biodisponibilidade

Particularmente para compostos administrados pela via oral, a efetividade terapêutica depende de fatores como solubilidade no fluido gastrointestinal, extensão de absorção pelo epitélio intestinal, biodisponibilidade, estabilidade metabólica, dentre outros fatores (CHAN; STEWART, 1996; HORTER; DRESSMAN, 2001; JAMBHEKAR; BREEN, 2013). A maioria dos compostos fenólicos apresentam baixa biodisponibilidade oral (cerca de 10%) em decorrência de suas características químicas (HU, 2007). Estas particularidades poderiam explicar, em parte, a inobservância de efeito farmacológico frequentemente observada em estudos de intervenção *in vivo*, apesar de inúmeros estudos destacarem os efeitos farmacológicos destes compostos *in vitro*, nos quais estratégias de solubilização são empregadas para a realização dos testes, como a dissolução em dimetilsulfóxido. A aparente discrepância entre estes estudos pode ser parcialmente justificada pela baixa absorção e fraca biodisponibilidade oral, bem como pelo extenso metabolismo hepático destes compostos (WILLIAMSON; MANACH, 2005).

Similarmente, o uso farmacológico do PTS, especialmente quando administrado pela via oral pode ser limitado, devido ao seu caráter lipofílico e consequente baixa

hidrossolubilidade (aproximadamente 21 ug/mL) (BETHUNE et al., 2011). Segundo o sistema de classificação biofarmacêutica, esta característica química categoriza substâncias lipofílicas, como o PTS, em compostos de classe II, contemplando substâncias que apresentam alta permeabilidade e baixa solubilidade e estão sujeitos a problemas relacionadas com a biodisponibilidade (FDA, 2017). Portanto, uma melhor compreensão das propriedades físico-químicas de bioativos é relevante para o desenvolvimento de um sistema de liberação otimizado para administração oral de compostos fenólicos (BLUME et al., 2000; PENG et al., 2018).

Neste contexto, a baixa hidrossolubilidade do PTS no trato gastrointestinal pode ser considerada uma barreira para biodisponibilidade oral, reduzindo o seu efeito terapêutico (YEO et al., 2013). Diante disso, mudanças nas propriedades físicas e químicas do PTS promovem melhora no perfil farmacocinético e aumentam sua biodisponibilidade oral, intensificando potenciais efeitos farmacológicos (PINHO et al., 2014). Assim, estratégias farmacotécnicas, como a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas, que possibilitem o aumento da hidrossolubilidade aparente do PTS, sem reduzir suas propriedades biológicas podem ser consideradas uma alternativa para minimizar a baixa hidrossolubilidade (CHOO et al., 2014; LOFTSSON; BREWSTER, 2012).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos de origem natural, que apresentam uma cavidade interna hidrofóbica e uma superfície externa hidrofílica, possibilitando o encapsulamento molecular de fármacos lipofílicos (LOFTSSON; BREWSTER, 2012; PINHO et al., 2014). A complexação de moléculas com ciclodextrinas promove modificações nas propriedades físico/químicas das moléculas hospedes, aumentando sua hidrossolubilidade e estabilidade (SZETJLI, 1998). Derivados de ciclodextrinas naturais, como a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) apresenta características que permitem sua utilização, tanto para estudos *in vitro* quanto *in vivo*, devido a sua baixa toxicidade e alta hidrossolubilidade (LOFTSSON; BREWSTER, 2011; LÓPEZ-NICOLÁZ et al., 2009). Neste sentido, a utilização de ciclodextrinas como agentes promotores de hidrossolubilidade do PTS revela-se oportuna podendo facilitar a entrega e permeação dessa molécula nas camadas de difusão existentes na superfície do epitélio gastrintestinal, aumentando sua concentração plasmática (LOFTSSON; BREWSTER, 2011; YEO et al., 2013). Os achados de Yeo e cols. (2013) evidenciam que o PTS complexado com HP β CD, administrado pela via oral, apresenta-se cerca de 4 vezes mais biodisponível do que o PTS em suspensão (não-complexado), confirmando que a baixa hidrossolubilidade constitui-

se numa barreira para a sua biodisponibilidade. Ainda, o perfil de biodistribuição de PTS foi investigado utilizando uma solução formulada com HP β CD. Verificou-se que esta formulação facilita o alcance do PTS ao fígado, coração e pulmões de modo abundante (CHOO et al., 2014). Outra vantagem adicional do uso de ciclodextrinas em formulações farmacêuticas, se dá porque a complexação protege moléculas bioativas contra a degradação decorrentes de fatores tais como temperatura, pH e exposição à luz, podendo manter a estabilidade química de alguns compostos bioativos (PINHO et al 2014; SZETJLI 1998).

Embora vantajoso e promissor, poucos estudos se dedicam a explorar os efeitos terapêuticos do PTS complexado a ciclodextrina (Figura 2) em modelos biológicos especialmente relacionados a disfunções cardiovasculares.

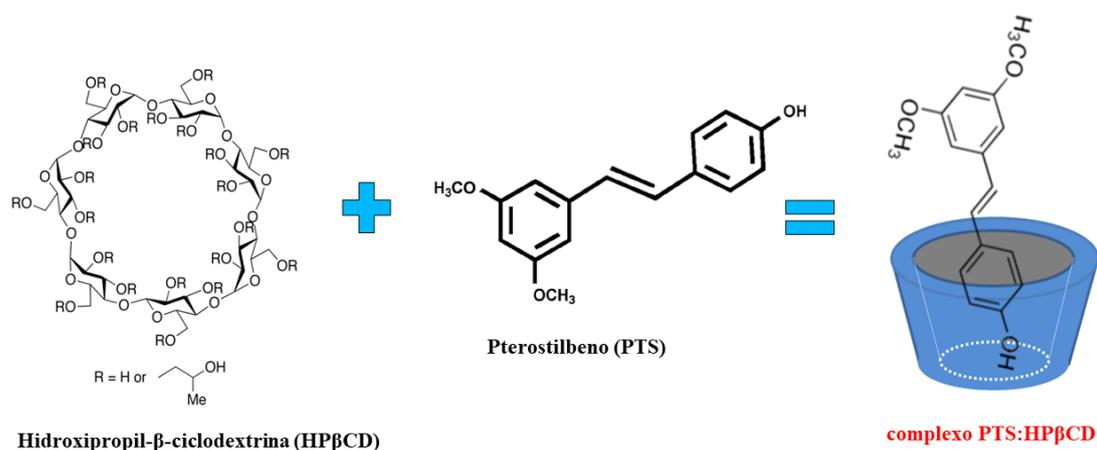


Figura 2: Desenho esquemático do complexo de inclusão PTS:HP β CD

1.3 Remodelamento ventricular e insuficiência cardíaca

A insuficiência cardíaca (IC) é uma doença crônica caracterizada por incapacidade do coração de manter o fluxo sanguíneo necessário para satisfazer as demandas metabólicas do corpo, representando uma das principais causas de morte no mundo (GOLDBERG, 2010). A IC é considerada uma pandemia global em rápido crescimento, com uma prevalência estimada de 37,7 milhões de indivíduos em todo o mundo. O comprometimento funcional cardíaco pode ser secundário a muitas etiologias, acarretando sintomas que afetam a qualidade de vida dos indivíduos doentes, incluindo dispnéia, fadiga, baixa tolerância ao exercício e retenção de líquidos (ZIAEIN; FONAROW, 2016).

A terapia farmacológica para IC inclui uma combinação de medicamentos, cuja indicação clínica dependerá da sintomatologia do doente e das contraindicações de cada fármaco (REIS FILHO et al., 2015). A abordagem terapêutica objetiva melhorar os sintomas e a capacidade funcional, prevenir a dilatação da câmara cardíaca, proporcionar qualidade de vida, reduzir a frequência de hospitalizações e mortalidade associada (BERLINER; BAUERSACHS, 2017). Está descrito que tanto a ativação simpática contínua quanto os efeitos proliferativos da angiotensina II afetam adversamente o cardiomiócito e a função contrátil da câmara levando à deterioração da função cardíaca (BERLINER; BAUERSACHS, 2017). Neste contexto, o bloqueio farmacológico destas vias, ou seja, através da administração de betabloqueadores associados à Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (IECA) ou Bloqueadores de Receptores da Angiotensina II (BRA) determinam benefícios diretos sobre o remodelamento cardíaco, visto que os IECA previnem a dilatação cardíaca e os betabloqueadores revertem, efeitos que melhoram o prognóstico dos indivíduos com IC (BERLINER; BAUERSACHS, 2017; REIS FILHO et al., 2015).

Segundo a Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca (2012) a estratégia de tratamento disponível integra os fármacos betabloqueadores, IECA ou BRA, Diuréticos, Nitratos, Anticoagulantes, Antiagregantes plaquetários, Antiarrítmicos, Bloqueadores de canais de cálcio, Ivabradina, ômega 3, Inibidores da Fosfodiesterase 5 e Moduladores do Metabolismo Energético Miocárdico (BOCHI et al., 2012). Apesar dos avanços significativos em terapias e prevenção, a mortalidade e a morbidade ainda são extremamente altas (SAVARESE, 2017).

O remodelamento ventricular (ou cardíaco) precede o desenvolvimento e progressão da IC, no qual as câmaras cardíacas aumentam progressivamente e a função contrátil se deteriora. (COHN et al., 2000). Esse evento é caracterizado por alterações moleculares, celulares e intersticiais que se manifestam clinicamente através da alteração de tamanho, massa, geometria e função da câmara cardíaca em resposta à sobrecarga hemodinâmica (pressão/volume) e/ou lesão cardíaca, associada à ativação neuro-hormonal (AZEVEDO et al., 2016). Essas alterações levam à dilatação da câmara, redução da contratilidade, aumento do estresse de parede, hipertensão, morte de cardiomiócitos (COHN et al., 2000). De fato, diferentes mecanismos contribuem para o desenvolvimento e progressão do remodelamento cardíaco, incluindo alterações no metabolismo energético cardíaco, indução de morte celular, disfunção de proteínas contráteis e colágeno, alteração no transporte de cálcio, inflamação e estresse oxidativo

(SCHIRONE et al., 2017; AZEVEDO et al., 2016). Esses fatores podem ter vários efeitos sobrepostos prejudiciais resultando em IC e mau prognóstico (SCHIRONE et al., 2017; AZEVEDO et al., 2016).

O remodelamento ventricular pode ocorrer por meio de mecanismo adaptativo (fisiológico) ou mal adaptativo (adverso/patológico). No primeiro caso, ocorrem alterações estruturais a fim de se adaptar e manter a função cardíaca normal. Porém, quando submetido ao estresse sustentado, o remodelamento cardíaco leva a uma disfunção progressiva e irreversível do coração (COHN et al., 2000).

Interessantemente, o remodelamento mal adaptativo pode provocar disfunção tanto no ventrículo direito (VD) quanto no ventrículo esquerdo (VE) (KONSTAM et al., 2011; NORTON et al., 2002). O remodelamento ventricular direito pode ser decorrente de vasoconstrição e hipertensão arterial pulmonar, que provocam aumento de pós-carga ao ventrículo direito, gerando hipertrofia excêntrica, dilatação da câmara, redução da fração de ejeção e débito cardíaco (MCLAUGHLIN et al., 2011).

No ventrículo esquerdo, o remodelamento adverso deriva de eventos isquêmicos como o infarto agudo do miocárdio (IAM), dentre outros fatores, prejudicando a função tanto de cardiomiócitos infartados quanto de remanescentes (GAJARSA; KLONER, 2011). Para manter a função cardíaca pós-infarto, os cardiomiócitos remanescentes são expostos a uma carga de trabalho maior, resultando inicialmente em hipertrofia compensatória e posterior redução da espessura da parede, dilatação da câmara esquerda, fibrose e morte celular por ativação de apoptose e/ou autofagia (KONSTAM et al., 2011). A taxa de morte de cardiomiócitos no tecido remanescente é um preditor da gravidade do remodelamento e determinará a taxa de progressão para IC (ABBATE; NARULA, 2012).

O diagnóstico clínico de remodelamento ventricular é baseado na sintomatologia e na detecção de alterações morfológicas, incluindo alterações no diâmetro da cavidade, massa (hipertrofia e atrofia), geometria (espessura e forma da parede de ambos ventrículos), áreas de cicatriz após infarto e fibrose (COHN et al., 2000). Os métodos mais utilizados para detectar essas alterações são exames de imagem, como ecocardiografia, ventriculografia e ressonância magnética nuclear (ANAND et al., 2002).

1.4 Remodelamento ventricular: mecanismos fisiopatológicos

Diversas vias moleculares convergem no remodelamento cardíaco adverso. Por exemplo, evidências descrevem que a perda de cardiomiócitos pode ocorrer por necrose, apoptose ou autofagia, enquanto fibrose ocorre por meio da proliferação de fibroblastos

e reorganização da matriz extracelular (BURCHFIELD et al., 2013; WHELAN et al., 2010).

Apoptose ou morte celular programada de células cardíacas promove perda de tecido viável que pode ter um efeito desastroso sobre a geometria e a função ventricular, processo fundamental na progressão para IC (VAN et al., 2005). Ocorre degeneração e fragmentação da célula e formação de corpos apoptóticos que são fagocitados por macrófagos, mecanismo que não gera estímulos inflamatórios (WHELAN et al., 2010). A apoptose pode ser controlada e ativada por via de sinalização intrínseca (mitocondrial) e extrínseca (disparada por receptores de membrana plasmática), sendo que ambas vias culminam na ativação de caspases, família de proteínas que induz apoptose (WHELAN et al., 2010). Os estímulos pró-apoptóticos são transmitidos, em sua maioria, através da via intrínseca, que pode ser ativada por mecanismos de dano oxidativo celular, toxinas, ativação de vias de sinalização de sobrevivência, dentre outros (TRACHOOTAM et al., 2008). A formação de poros e a permeabilidade mitocondrial é regulada pelo balanço entre proteínas Bcl-2 (anti-apoptótica) e Bax (pró-apoptótica) (TRACHOOTAM et al., 2008). Abbate e cols (2003) evidenciaram que a apoptose de cardiomiócitos foi determinante para o remodelamento desfavorável do VE e insuficiência sintomática precoce em humanos, com causa morte atribuída ao IAM.

Outro importante contribuinte para o remodelamento ventricular é a autofagia sustentada, um processo catabólico que ocorre em resposta ao estresse, direcionando proteínas, macromoléculas e organelas para a degradação lisossomal (GURUSAMY et al., 2009). Durante a autofagia, diversos constituintes citosólicos são envolvidos por vesículas de membrana dupla, autofagossomos, que depois se fundem com os lisossomos ou com o vacúolo para degradar sua carga (GATICA et al., 2015). A falha em mecanismos de controle fino da autofagia, causa ativação de morte celular, contribui para o processo de transição no remodelamento cardíaco patológico (ZHU et al., 2007). A ativação exacerbada de mecanismos autofágicos em fibroblastos cardíacos produz degradação aumentada do colágeno Tipo 1, prejudicando a integridade da matriz extracelular (LAVANDERO et al., 2015). Em cardiomiócitos de camundongos transgênicos, a elevada reexpressão de beclina 1, proteína necessária para formação do autofagossomo, amplifica substancialmente o remodelamento adverso (MOSCAT; DIAZ-MECO, 2009).

Além disso, redução de contratilidade pode ser causada por disfunção mitocondrial e anormalidades metabólicas, contribuindo para a disfunção cardíaca

(BURCHFIELD et al., 2013; WHELAN et al., 2010). A homeostase do cálcio e consequentemente, prejuízo no acoplamento excitação-contração em cardiomiócitos também pode ser prejudicado durante o remodelamento ventricular. Ocorre deficiência na liberação e captação do íon cálcio (Ca^{2+}) pelo retículo sarcoplasmático, mecanismos mediados por proteínas como Cálcio ATPase SERCA, fosfolamban e receptores rianodina (LEHNART et al., 2009). Portanto, o mecanismo de remodelamento reduz a oferta de cálcio durante a sístole e aumenta a concentração de cálcio na diástole, prejudicando tanto o mecanismo de contração quanto o de relaxamento (AZEVEDO et al., 2016). O desequilíbrio do Ca^{2+} , além promover disfunção sistólica e arritmias, pode interferir em processos como o crescimento hipertrófico, metabolismo energético, função mitocondrial e sobrevivência celular (BURCHFIELD et al., 2013). Essas alterações são manifestadas por mudanças na geometria do coração (passando de uma forma elíptica para esférica) e hipertrofia, podendo comprometer a fração de ejeção (SCHIRONE et al., 2017).

A inflamação e a oxidação também afetam diretamente a contratilidade cardíaca e o relaxamento. A resposta inflamatória exacerbada induzida por macrófagos e monócitos pós-infarto prejudica o processo de cicatrização do tecido danificado, induzindo fibrose, remodelamento adverso e redução da contratilidade (ANZAI, 2018). Além disso, a ativação neuro-hormonal, induzida pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona, aumenta a síntese de proteínas envolvidas na inflamação, estimulando o estresse oxidativo e a morte celular de cardiomiócitos (SCHIRONE et al., 2017). Pós injúria cardíaca, a sinalização inflamatória é sustentada através da regulação positiva da liberação de citocinas, levando à proliferação de fibroblastos e ativação de metaloproteinases (FRANGOGIANNIS 2012).

Evidências sugerem que mecanismos de dano oxidativo e desequilíbrio na sinalização redox, associados à alteração no metabolismo energético ventricular desencadeiam cascatas de sinalização hipertrófica e dilatação da câmara cardíaca, resultando em perda progressiva de cardiomiócitos, fatores que conjuntamente prejudicam progressivamente a função cardíaca (TAKIMOTO et al., 2007; TSUTSUI et al., 2011).

1.5 O impacto do estresse oxidativo no remodelamento ventricular

O desequilíbrio redox intracelular também contribui para o remodelamento ventricular adverso, sendo este mecanismo ativado pelo aumento da produção de espécies

reativas de oxigênio (EROs) e/ou nitrogênio (ERNs), subprodutos do metabolismo aeróbico (SANTOS et al., 2011; SHAH; CHANNON, 2004). Estas espécies incluem o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($\cdot OH$), óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ($ONOO^-$), dentre outros, que são capazes de oxidar proteínas, lipídios e ácido desoxirribonucleico prejudicando a homeostase das células cardíacas (BELLÓ-KLEIN et al., 2014; KEMP; CONTE, 2012). Neste contexto, as altas concentrações de oxidantes em relação a sistema de defesa antioxidante intrínseco promovem dano e perturbam a homeostase celular, caracterizando o estresse oxidativo e/ou nitrosativo (SIES, 1985). Mais recentemente, o estresse oxidativo foi definido como uma situação em que a concentração de EROs no estado estacionário pode ser transitória ou cronicamente aumentada, perturbando o metabolismo celular e sua regulação, além de prejudicar os constituintes celulares (LUSHCHAK, 2011). Ainda, o termo “distress” tem sido relacionado a uma definição mais atual (NIKI, 2016). Interessantemente, uma classificação para o estresse oxidativo, baseada em níveis de intensidade, tem sido proposta em sistemas biológicos, sendo classificada em estresse oxidativo basal, estresse oxidativo de baixa intensidade, estresse oxidativo de intensidade intermediária e estresse oxidativo de alta intensidade, diferenças decorrentes a concentração de indutores (EROs) e parâmetros finais avaliados (LUSHCHAK, 2014).

O acúmulo de espécies oxidantes sobrecarrega o sistema antioxidante enzimático primário, gerenciado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD; converte ânion superóxido em peróxido), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), ambas conjuntamente reduzem H_2O_2 em água (WALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007). Em relação as defesas antioxidantes não-enzimáticas, destaca-se o papel da glutathione na remoção de EROs. Composta por aminoácidos que contêm grupos tióis (glutamato, cisteína e glicina), a forma reduzida da glutathione (GSH) serve como doador de elétrons para a redução de peróxidos, reação catalisada pela enzima GPx, sendo convertida em glutathione oxidada (GSSG). A reciclagem da glutathione ocorre pela ação da glutathione reductase (GR), que catalisa a conversão de GSSG a GSH, pela transferência de elétrons do nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) mantendo íntegro o principal sistema de proteção antioxidante celular não enzimático (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; VASCONCELOS et al., 2007). Além disso, a GSH reage não enzimaticamente com radicais como $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ e $ONOO^-$, atuando como um varredor direto de EROs (JONES, 2002).

Adicionalmente, o sistema tiorredoxina, incluindo a tiorredoxina (TRx), tiorredoxina redutase (TRxR) e NADPH que formam um sistema integrado adicional às defesas antioxidantes das células, funcionando como poderosa proteína dissulfeto oxidorreductase (TSUTSUI et al., 2011).

Diversos trabalhos demonstram os efeitos deletérios do desequilíbrio redox sobre a função ventricular (BELHAJ et al., 2013; CASTRO et al., 2014; DAI et al., 2011). Por exemplo, em um modelo de hipertensão arterial pulmonar a falência do ventrículo direito foi associada à regulação negativa da proteína de resposta ao estresse heme oxigenase-1 (HO-1) e a ativação de processos inflamatórios locais (BELHAJ et al., 2013). Shiomi e cols. (2004) demonstraram significativa redução no remodelamento do VE após IAM em camundongos transgênicos que superexpressam a glutathione peroxidase, uma importante enzima antioxidante. Tanto a modulação do balanço redox, quanto a administração exógena de tiorredoxina estão associados à cardioproteção e prevenção do remodelamento mal adaptativo, por redução de apoptose de cardiomiócitos em modelo de IAM (CASTRO et al., 2014; TÃO et al., 2006). Em outro trabalho, a superexpressão de catalase mitocondrial em camundongos transgênicos com cardiomiopatia hipertensiva, reduziu tanto a fibrose quanto a hipertrofia, sugerindo que terapias antioxidantes podem prevenir o remodelamento (DAI et al., 2011).

De fato, o acúmulo de EROs e o estresse oxidativo não só estão associados ao dano direto a biomoléculas e organelas, mas também se relacionam à modulação das vias de sinalização intracelular que regulam o remodelamento cardíaco (Figura 3) (ZHANG et al., 2016). Muitas proteínas que participam destas vias de sinalização sofrem regulação redox, podendo direcionar respostas de estresse adaptativas ou mal adaptativas, sendo o equilíbrio entre essas vias determinante para adaptação ou falha em condições patológicas de sobrecarga ventricular (SANTOS et al., 2011; TRACHOOTAM et al., 2008). Interessantemente, o $\cdot\text{OH}$ é capaz de causar oxidação severa e disfunção cardíaca mal adaptativa, mesmo em concentrações muito baixas (escala subnanomolar), enquanto que as EROs menos oxidativas (como $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e NO) estão comumente envolvidas na transdução do sinal em cardiomiócitos, gerando impacto em respostas cardíacas tanto adaptativas, quanto mal adaptativas (SANTOS et al., 2011).

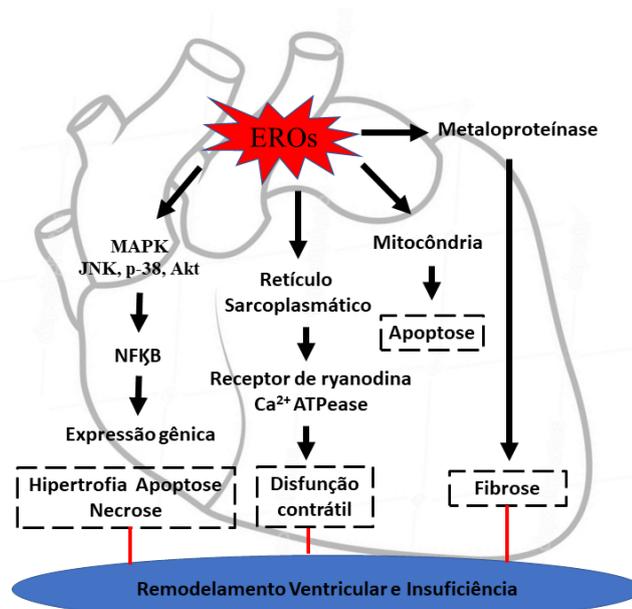


Figura 3: Potenciais alvos moleculares das EROs durante o remodelamento ventricular e insuficiência cardíaca. Adaptado de Tsutsui et al., 2011. EROs: espécies reativas de oxigênio; MAPK: proteínas quinases ativadas por mitógenos; JNK: quinase c-Jun N-terminal; p-38: p-38 MAP-quinase; AKT: serina/treonina quinase; NF-κB: fator nuclear kappa B; Ca²⁺ATPase: bomba transportadora cálcio.

A sinalização redox envolve a oxidação dos resíduos de cisteína de proteínas mediada por H₂O₂. Esta espécie oxida o ânion tiolato, gerando a forma sulfênica (Cys-SOH) e causando alterações alostéricas dentro da proteína que alteram sua função. A forma sulfênica pode ser reduzida pelas enzimas dissulfeto redutases, como Trx e glutaredoxina (Grx), para retornar à função da proteína ao seu estado original (WINTERBOURN; HAMPTON, 2008). Assim, a oxidação de primeiro grau dos resíduos de cisteína em proteínas serve como um mecanismo de transdução de sinal reversível (SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

Modificações redox pós-tradução para proteínas miocárdicas pode afetar a conformação, estabilidade e atividade de diversos receptores, transportadores iônicos (bombas/trocadores/canais), proteínas cinases, fosfatases, caspases, translocadores (GTPases), fatores de transcrição, assim como proteínas estruturais/contráteis, perturbando a homeostase cardíaca (SANTOS et al., 2011). As EROs exercem efeitos centrais sobre a fibrose e remodelação da matriz extracelular em cardiomiócitos, por estimular a proliferação de fibroblastos cardíacos e ativar as metaloproteinases da matriz mitocondrial (MMPs) (DUARTE et al., 2009). As espécies reativas também

desempenham um papel importante na estimulação hipertrófica acoplada à proteína G, por meio da estimulação α -adrenérgica e da angiotensina II (KASS; TAKIMOTO, 2007).

Dentre os principais mediadores de sinalização induzidos por EROs estão proteínas quinases como quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2), quinase c-Jun N-terminal (JNK), p-38 MAP-quinase (p38) e serina/treonina quinase (AKT). A ativação das proteínas ERK1/2 e AKT é induzida por baixas concentrações de EROs e está associada a sobrevivência e citoproteção na adaptação cardíaca (KWON et al., 2003). Por outro lado, as proteínas ativação da JNK e p38 são estimuladas em resposta ao estresse oxidativo, desencadeando apoptose e contribuindo para a progressão da IC (LOU et al., 2005). Altas concentrações de EROs participam de mecanismos de apoptose através da ativação de cinases de sinalização pró-apoptóticas e por dano oxidativo mitocondrial, enquanto que efeitos opostos foram observados, quando as EROs se mantêm em níveis baixos (KASS; TAKIMOTO, 2007). Adicionalmente, outras proteínas redox sensíveis são particularmente importantes para a função e homeostase de cardiomiócitos, incluindo proteína cinase A (PKA) (BRENNAN et al., 2006), proteína cinase G (PKG) (BURGOYNE et al., 2007), receptor de rianodina (RyR) (XU et al., 1998), e histona desacetilase de classe II (AGO et al., 2008).

Finalmente, os EROs influenciam diretamente a função contrátil, modificando as proteínas centrais para o acoplamento excitação-contração. Isso inclui a modificação de grupos -SH no receptor de rianodina (aumentando o tempo de abertura) e interação oxidativa e nitrosativa com Ca^{2+} ATPase reticular sarcoplasmática para inibir a captação de Ca^{2+} (KASS; TAKIMOTO, 2007).

De fato, a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no processo de hipertrofia e remodelação cardíaca é fundamental para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos, principalmente porque as taxas de mortalidade relacionadas ao remodelamento/disfunção cardíaca permanecem elevadas (RABABA'H et al., 2018). Neste contexto, a identificação de novos compostos com eficácia biológica e clínica é necessária para expandir as opções terapêuticas a fim de prevenir/tratar o remodelamento ventricular mal-adaptativo e progressão para IC (SCHIRONE, 2017).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade, determinar a dose terapêutica, potencial antioxidante do pterostilbeno complexado à ciclodextrina (complexo PTS:HP β CD), bem como seu efeito sobre parâmetros funcionais e na modulação de vias redox sensíveis no ventrículo direito e esquerdo de ratos com insuficiência cardíaca.

2.2 Objetivos Específicos

Explorar aspectos tecnológicos farmacêuticos (a fim de melhorar solubilidade do PTS), assim como determinar um curva de dose efetiva e segura, mediante à:

- ✓ Complexação do pterostilbeno com hidroxipropil- β -ciclodextrina.
- ✓ Caracterização do complexo PTS:HP β CD formado sob o ponto de vista químico e físico.
- ✓ Avaliação de três diferentes doses do complexo PTS:HP β CD, sobre parâmetros morfométricos de órgãos, capacidade antioxidante, função hepática, metabolismo da glicose e apoptose no fígado de ratos.

Determinar ação do complexo PTS:HP β CD em ratos com insuficiência ventricular direita, mediante a:

- ✓ Indução de *Cor pulmonale* por meio do modelo de hipertensão pulmonar por administração de monocrotalina.
- ✓ Medida de parâmetros hemodinâmicos, morfométricos e ecocardiográfico do VD
- ✓ Identificação do impacto sobre a lipoperoxidação, carbonilação de proteínas, concentração de espécies reativas, concentração de sulfidrilas, e conteúdo de GSH e GSSG.
- ✓ Investigação do efeito sobre a atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GST), glutathione reductase (GR) e glutarredoxina (GRx)

- ✓ Avaliar o efeito do tratamento com o complexo PTS:HP β CD sobre proteínas responsáveis pela contratilidade (serca, fosfolamban) no VD de ratos submetidos ao remodelamento maladaptativo causado por *Cor pulmonale*.

Identificar o efeito do complexo PTS:HP β CD em ratos com insuficiência ventricular esquerda, por meio da:

- ✓ Indução do infarto do miocárdio pela ligadura da coronária esquerda descendente.
- ✓ Avaliação da lipoperoxidação, conteúdo de GSH, GSSG e GSH/GSSG, bem como sobre a atividade da GR, GST, TRx e GRx.
- ✓ Determinação da expressão de Nrf2 no remodelamento do VE pós IAM.
- ✓ Avaliação da expressão de proteínas envolvidas na sinalização para a sobrevivência (AKT total e fosforilada), assim como, para apoptose (GSK-3 β total e fosforilada).

3. Abordagem Metodológica

3.1 Reagentes

PTS foi adquirido da Changha Organic Herb (Changha, China). HP β CD fornecida pela Roquette Frères (Lestrem, França). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico ou grau HPLC.

3.2 Preparo do complexo PTS:HP β CD

A HP β CD foi utilizada para promover a solubilidade do PTS em meio aquoso, por meio de sua complexação. O complexo PTS:HP β CD foi obtido através da solubilização de 0,3 M de HP β CD em água, seguida da adição do PTS 0,6 M, sob agitação a 37°C por 72 horas (YEO et al., 2013). Posteriormente, a mistura foi filtrada e o teor de pterostilbeno determinado no filtrado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), método adaptado de Lin e cols. (2009). O filtrado contendo o complexo PTS:HP β CD foi seco por liofilização (liofilizador modular Edwards MODULYO 4K), resultando num produto sólido.

3.3 Preparo da mistura física PTS:HP β CD

Para comparação, uma mistura física contendo PTS e HP β CD foi preparada em gral de vidro. PTS e HP β CD foram pesados com precisão na proporção molar de 1:1 (m/m) e cuidadosamente misturados durante 30 min.

3.4 Caracterização do complexo PTS:HP β CD

3.4.1 Análise térmica

A análise térmica foi realizada por meio de calorimetria diferencial de exploratória (DSC) com o intuito de registrar a variação de energia calorífica de uma substância em função da temperatura. Para este método foi utilizado o calorímetro Shimadzu DSC-60. Para esta metodologia foram utilizados cerca de 1 a 2 mg das amostras: pterostilbeno, HP β CD, mistura física e complexo (PTS:HP β CD) secos por liofilização. As seguintes condições foram empregadas na análise: atmosfera de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹, e resolução de 10°C.min⁻¹ (25 a 400°C). Os dados foram obtidos utilizando TA Analysis Software.

3.4.2 Espectroscopia no infravermelho

Os espectros no infravermelho de transformada de Fourier foram obtidos em espectrômetro Spectrum BX FTIR equipado com um acessório ATR MIRacle. Foram acumuladas vinte varreduras para todas as amostras (PTS, HPBCD, complexo e mistura física PTS:HPBCD), no intervalo de 4000-400 cm^{-1} com taxa de varredura de 4 cm^{-1} .

3.4.3 Análise por ressonância magnética nuclear de prótons

A análise por ressonância magnética nuclear (^1H RMN) foi realizada utilizando-se espectrômetro Bruker ASCEND 400 MHz e D₂O como solvente. Os espectros de ^1H RMN unidimensionais foram adquiridos sob condições padrão. Espectros homonucleares 2D-ROESY bidimensionais foram obtidos a fim de obter informações sobre as interações entre PTS: HP β CD, no complexo e mistura física.

3.4.4 Potencial antioxidante de captura radical total (TRAP)

O TRAP mede a capacidade antioxidante total, baseando-se na decomposição do dicloridrato de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano), que gera radicais livres e emite luz. Estes radicais, por sua vez, reagem com o luminol, formando outro radical livre mais energético com maior emissão de luz, que é mais facilmente detectado pelo contador-beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Suécia) (LISSI; PASCUAL; CATILHO 1942).

3.5 Estudos *in vivo*

3.5.1 Animais

Para este estudo foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando 250 g, provenientes do CREAL-UFRGS. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, agrupados ($n = 4/\text{caixa}$) em caixas de polipropileno (33 x 17 x 40 cm), sob condições de iluminação claro/escuro de 12 horas, temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e umidade (55%) controladas, com livre acesso à água e alimento.

3.5.2 Cálculo Amostral

Para a indução do modelo de remodelamento ventricular direito, o tamanho amostral foi calculado pelo do programa *Sigma Plot 11.0*. No cálculo do tamanho da

amostra, foram considerados probabilidade de erro $\alpha = 0.05$ e poder do teste estatístico ($1-\beta$ probabilidade de erro) = 0.95. Para o experimento envolvendo o modelo de *Cor pulmonale* (experimento 1), o n calculado foi 10 animais por grupo experimental (8 grupos). No entanto, de acordo com resultados encontrados na literatura, taxa de mortalidade nos animais tratados com monocrotalina para indução da insuficiência cardíaca direita (ICD) é de aproximadamente 25%. Assim, nos grupos de animais (MCT) induzidos a insuficiência cardíaca, é recomendado acrescentar mais 4 animais ao tamanho amostral calculado (SOUZA-RABBO et al., 2008). Portanto, para o experimento 1 foram necessários 96 animais.

Para indução do remodelamento ventricular esquerdo decorrente do infarto do miocárdio, o tamanho amostral foi calculado através do programa *Sigma Plot 11.0*, sendo considerados probabilidade de erro $\alpha = 0,05$ e poder do teste estatístico = 0,80. O tamanho de efeito calculado foi = 0,7 baseando-se nos valores de médias e desvios padrões entre os grupos SHAM e IAM para o parâmetro fração de ejeção (%EF) apresentados no trabalho de Teixeira e cols. (2017). O n calculado, portanto, foi de 8 animais por grupo (3 grupos experimentais), totalizando 24 animais.

3.5.3 Desenho Experimental

Para determinar os efeitos do complexo PTS:HP β CD sobre o remodelamento do VD e VE foram utilizados dois diferentes modelos experimentais, como se segue.

3.5.3.1 Remodelamento do VD: indução da hipertensão arterial pulmonar e demais procedimentos

Hipertensão arterial pulmonar induz remodelamento do ventrículo direito e progressão para insuficiência cardíaca. Neste modelo experimental, foram utilizados 64 ratos Wistar machos, adultos, divididos em grupo controle (CTR; n=7) e grupo submetido ao modelo de hipertensão pulmonar (MCT; n=7-8). A hipertensão pulmonar foi induzida pela administração do alcaloide monocrotalina (Crotaline – C240 SIGMA) 60mg/kg via intraperitoneal (SINGAL et al., 2000). Após 7 dias da indução (período para o desenvolvimento da doença cardíaca direita), tanto os animais CTR como MCT receberam doses diárias do complexo PTS:HP β CD correspondentes a 25, 50 ou 100 mg/kg/dia de PTS (grupos: MCT25; MCT50; MCT100, respectivamente) ou veículo (solução aquosa com HP β CD) (grupos: CTR0 e MCT0), via gavagem, por um período de

14 dias. Ao final do período experimental, os animais foram anestesiados com xilazina (20 mg/kg i.p.) e ketamina (90 mg/kg i.p.) e submetidos à avaliação da função ventricular direita por meio de ecocardiografia. Ainda sob o efeito da anestesia, foi realizado cateterismo da veia jugular para avaliação dos parâmetros hemodinâmicos. Posteriormente, os animais foram eutanasiados, sendo o fígado, o coração e os pulmões retirados e pesados. Os ventrículos foram separados e pesados, e o VD utilizado para as análises bioquímicas e moleculares.

Durante a avaliação ecocardiográfica, as imagens foram obtidas por modo bidimensional e modo-M (Philips HD7 Ultrasound System; Andover, MA, EUA), utilizando um transdutor S12-4 (Philips; Andover, MA, USA). Para determinar a função sistólica e diastólica direita, os seguintes parâmetros foram avaliados: fração de encurtamento (FEC), mudança de área fracional (FAC), excursão sistólica do plano do anel da tricúspide (TAPSE) e razão E/A (RUDSKI et al., 2010).

Os parâmetros hemodinâmicos foram determinados para estimar os efeitos do complexo PTS:HP β CD sobre a função cardíaca. A monitorização da pressão sistólica (PSVD mmHg) e diastólica final do VD (PDFVD mmHg) foi mensurada pela canulação do VD, com auxílio de um cateter conectado a um transdutor e amplificador de pressão (SCHENKEL et al., 2010). A partir dos registros da onda de pressão ventricular direita e detecção de pontos máximos e mínimos de cada ciclo cardíaco, foram obtidos os valores positivos da derivada de contração (dP/dtmáx) e negativos da derivada de relaxamento (dP/dtmin) que foram em mmHg/s (SOUZA-RABBO et al., 2008).

O peso dos animais foi monitorado (2 vezes/semana) para correção de dose do complexo PTS:HP β CD e verificar o efeito do tratamento sobre a variação de peso corporal. A fim de determinar o aumento de massa muscular do coração, foi utilizado o índice de hipertrofia do VD, calculado pela razão do peso em grama do ventrículo direito e esquerdo pelo comprimento da tíbia multiplicado por cem e expresso em porcentagem (HU et al., 2003).

3.5.3.2 Remodelamento do VE: indução do infarto agudo do miocárdio e demais procedimentos

O infarto agudo do miocárdio foi produzido por método cirúrgico previamente descrito por Johns e Olson (1954). Anterior ao procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados (ketamina 90 mg/kg e xilazina 20 mg/kg, i.p.) e submetidos a uma ligadura cirúrgica dos ramos anteriores descendentes da artéria coronária esquerda (grupo AMI)

ou a uma operação simulada em que todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados, exceto a sutura em torno da artéria coronária (grupo SHAM). Para minimizar a dor e o desconforto no pós-operatório, todos os animais foram tratados durante três dias com analgésicos tramadol (12,5 mg/kg, via subcutânea, de 12/12 horas) e dipirona (50 mg/kg, por gavagem, de 12/12 horas). Sete dias após o procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos a uma avaliação ecocardiográfica para confirmar a eficácia da cirurgia de infarto e foram divididos em três grupos: animais simulados (grupo SHAM), animais infartados não tratados (grupo IAM) e animais infartados e tratados (Grupo IAM + PTS). Posteriormente, os ratos IAM + PTS começaram a receber o complexo PTS: HPβCD em dose correspondente a 100 mg/kg/dia de PTS (AMI + PTS) e os ratos SHAM e AMI receberam o veículo (solução aquosa com HPβCD), diariamente por administração oral, por 8 dias. A dose de 100 mg/kg/ dia foi selecionada com base em resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa, evidenciados no VD (Lacerda et al., 2017). A mortalidade, avaliada 24 h após o procedimento cirúrgico, foi de aproximadamente 10%.

A função cardíaca esquerda foi analisada por ecocardiografia, 14 dias após a cirurgia. Os ratos foram anestesiados (ketamina 90 mg/kg e xilazina 20 mg/kg, i.p.) e colocados na posição de decúbito lateral esquerdo (45°) para obter imagens cardíacas. O sistema de ultra-som Philips HD7 XE com um transdutor L2-13 MHz foi utilizado. As áreas transversais sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo (cm²) foram obtidas pelo rastreamento da borda endocárdica em três níveis: basal, médio e apical. Os diâmetros sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo (cm) foram medidos usando o Modo-M (NOZAWA et al., 2006). A variação da área fracionada (%), medida como FAC = (área diastólica, área sistólica/área diastólica) × 100, foi utilizada para determinar a função contrátil e a função ventricular esquerda (NOZAWA et al., 2006). Em cada plano transversal ecocardiográfico, o arco correspondente aos segmentos com infarto (I) e o perímetro endocardial total (EP) foram medidos na diástole final. O tamanho do infarto (IS) foi estimado como % IS = (I / EP) × 100 (TAVARES et al., 2010).

Após o período experimental, os animais foram eutanasiados, o VE foi separado, pesado e utilizado para as análises bioquímicas e moleculares.

3.5.4 Morfometria e índice de hipertrofia ventricular

O peso dos animais foi monitorado (2 vezes/semana) para correção de dose do complexo PTS:HPβCD e verificar o efeito do tratamento sobre a variação de peso corporal. A fim de determinar o aumento de massa muscular do coração, foi utilizado o

índice de hipertrofia do VD e do VE, calculado pela razão do peso em grama do ventrículo direito e esquerdo pelo comprimento da tíbia multiplicado por cem e expresso em porcentagem (HU et al., 2003). A diferença entre o peso úmido e seco do pulmão e fígado foi utilizado para estimar congestão hepática e pulmonar (SINGAL et al., 2010).

3.5.5 Preparo do homogeneizado

Amostras de VD e VE foram homogeneizadas (OMNI Tissue Homogenizer, OMNI International, USA) durante 30 segundos em tampão KCl 1,15% (p/v) contendo 1% (v/v) de inibidor de proteases (fluoreto de fenil metil sulfonil; PMSF). Os homogeneizados foram centrifugados (1358 xg, 20 min, a 4°C; ALC Multispeed Refrigerated Centrifuge PK 121R, Thermo Electron Corporation, USA), sendo o sobrenadante coletado para a determinação dos parâmetros bioquímicos.

Para as análises moleculares de Western Blotting, ambos homogeneizados de VD e VE foram preparados com tampão Tris HCl 100mM + EDTA 5mM, pH=7,4 (Cell Lise) e cloreto de potássio (KCl) 1,15 % na proporção de 1:10 (v/v) + fluoreto de fenil metil sulfonil (PMSF) e homogeneizados durante 30 segundos (OMNI Tissue Homogenizer, OMNI International, USA). Ambas amostras foram centrifugadas a 8000 xg por 10 minutos. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry, utilizando-se albumina sérica bovina como padrão (LOWRY; ROSEBROUGH, 1951).

3.5.6 Ensaios bioquímicos e moleculares

A metodologia dos diferentes ensaios bioquímicos e moleculares apresentados nesta tese está detalhadamente descrita na seção material e método contida nos artigos. As técnicas utilizadas estão listadas abaixo:

- ✓ **Dosagens séricas de função hepática e renal:** proteínas totais, albumina, AST, ALT, GGT, ureia, creatinina, realizadas de acordo com metodologia descrita no kit comercial (LABTEST).
- ✓ **Avaliação de dano oxidativo tecidual:** substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (OHKAWA et al., 1979); lipoperoxidação (LPO) (GONZALEZ et al., 1991); carbonilas proteicas (REZNICK; PACKER, 1994).
- ✓ **Avaliação de espécies reativas totais:** ROS total (LEBEL et al., 1992);
- ✓ **Avaliação de defesas antioxidantes:** Conteúdo de sulfidrilas totais (AKSENOV; MARKESBERY, 2001); GSH e GSSG (AKERBOOM; SIES, 1981).

- ✓ **Atividade de enzimas antioxidantes:** SOD (MARKLUND, 1995); CAT (AEBI, 1984); GPx (FLOHE, 1984); GR (ANDERSON, 1985); GST (MANNERVIK; GUTHENBERG, 1981); TRxR (HOLMGREN; BJORNSTEDT, 1995) GRx (HOLMGREN; ASLUND, 1995).
- ✓ **Expressão proteica por western blotting:** AKT total e fosforilada; glicogênio sintase cinase 3- β (GSK-3 β) total e fosforilada; Nrf2; fosfolamban e cálcio ATPase SERCA (LAEMMLI, 1970).

3.5.7 Aspectos Éticos

Este projeto foi devidamente aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFRGS), sob número 28218. Todos os procedimentos desse estudo ocorreram de acordo com a Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008, que estabelece normas para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de animais; assim como àquelas contidas nos Princípios Internacionais Orientadores para a pesquisa Biomédica envolvendo Animais provenientes do Council for International Organizations of Medical Science (CIOMS) (GOLDIM, 1997).

4. Resultados

Os resultados obtidos na presente tese estão apresentados no formato de Artigos. Para facilitar a organização e o entendimento, os resultados foram compilados e descritos em capítulos, como se segue:

4.1 Capítulo I: Efeito do pterostilbeno complexado com ciclodextrina no fígado de ratos: potencial redução do estresse oxidativo e modulação de proteínas redox sensíveis

4.2 Capítulo II: Pterostilbeno reduz estresse oxidativo, previne hipertrofia e preserva a função sistólica do ventrículo direito em modelo de *Cor pulmonale*

4.3 Capítulo III: Pterostilbeno melhora o volume sistólico e o débito cardíaco em um modelo rato com insuficiência cardíaca direita através da modulação de proteínas do manejo de cálcio e estresse oxidativo

4.4 Capítulo VI: Estilbenoide pterostilbeno preserva a função ventricular esquerda após infarto do miocárdio em ratos: possível envolvimento de proteínas tios e modulação de GSK-3 β fosforilada

Capítulo I

4.1 Efeito do pterostilbeno complexado com ciclodextrina no fígado de ratos: potencial redução do estresse oxidativo e modulação de proteínas redox sensíveis

Este capítulo aborda a metodologia utilizada na complexação do pterostilbeno à ciclodextrina para melhorar sua solubilidade e viabilizar sua administração pela via oral em ratos. Adicionalmente, descreve os resultados da caracterização do complexo obtido sob aspectos físicos e investiga seu potencial antioxidante e a modulação de proteínas redox sensíveis.

Artigo Original intitulado:

Effect of pterostilbene complexed with cyclodextrin on rat liver: potential reduction of oxidative damage and modulation redox sensitive proteins

Este Artigo foi aceito para publicação no Periódico *Medicinal Chemistry Research* em 31/07/18. DOI: 10.1007/s00044-018-2233-6.

Capítulo II

4.2 Pterostilbeno reduz estresse oxidativo, previne hipertrofia e preserva a função sistólica do ventrículo direito em modelo de *Cor pulmonale*

Neste capítulo reportamos os efeitos cardioprotetores do pterostilbeno sobre o ventrículo direito (VD) de ratos com hipertensão pulmonar. Neste trabalho sugerimos que o mecanismo terapêutico deste fitofenol pode estar relacionado a redução na produção de ânion superóxido dependente de NADPH oxidase, redução do estresse oxidativo, assim como prevenção da remodelação mal adaptativa resultando em proteção da função sistólica do VD.

Artigo Original intitulado:

Pterostilbene reduces oxidative stress, prevents hypertrophy and preserves systolic function of right ventricle in *cor pulmonale* model

Este Artigo foi publicado no periódico *British Journal of Pharmacology*, 2017. DOI: 10.1111/bph.13948.

Capítulo III

4.3 Pterostilbeno, melhora o volume sistólico e o débito cardíaco em ratos: o papel da proteína SERCA e dos sistemas glutathiona e glutarredoxina na insuficiência cardíaca direita

No terceiro capítulo da presente tese mostramos que o pterostilbeno produz efeitos cardioprotetores em modelo de insuficiência cardíaca direita secundária a hipertensão arterial pulmonar, através da ativação do sistema da glutathiona e enzimas antioxidantes tióis. Estes efeitos denotam a habilidade antioxidante multialvo do PTS associado à modulação da expressão da proteína ATPase SERCA, resultando em proteção da função cardíaca direita, evidenciado pela melhora do volume sistólico e débito cardíaco.

Artigo Original intitulado:

Pterostilbene improves cardiac function in a rat model of right heart failure through modulation of calcium handling proteins and oxidative stress

Este Artigo foi publicado no periódico *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 2020. DOI: 10.1139/apnm-2019-0864.

Capítulo IV

4.4 Estilbenoide Pterostilbeno preserva a função ventricular esquerda após infarto do miocárdio em ratos: possível envolvimento de proteínas tiois e modulação de GSK-3 β fosforilada

Este capítulo aborda os efeitos farmacológicos do pterostilbeno sobre parâmetros antioxidantes e indução de apoptose no VE pós IAM. Neste estudo mostramos que o pterostilbeno modula a atividade de enzimas tiol-dependentes, aumenta a expressão de antioxidantes e eleva o limiar para a apoptose pós-infarto, resultando em uma redução da peroxidação lipídica e uma melhora da função sistólica.

Artigo Original intitulado:

Stilbenoid Pterostilbene Preserves Left Ventricular Function after Myocardial Infarction in Rats: Possible Involvement of Thiol Proteins and Modulation of Phosphorylated GSK-3 β

Artigo aceito para publicação no Periódico *Free Radical Research* em 26/07/18. DOI: 10.1080/10715762.2018.

5. DISCUSSÃO GERAL

Diversos estudos evidenciam propriedades terapêuticas do PTS, tanto em abordagens pré-clínica quanto clínica (RICHE et al., 2014; WU et al., 2017). Tais efeitos estão relacionados a ações antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica, anti-hipertensiva, antidiabética dentre outras (BHAKKIYALAKSHMI et al., 2016; GUO et al., 2016; PARI; SATHEESH, 2006; YANG et al., 2013; Wang et al., 2016). Estes estudos, em sua maioria, utilizaram o PTS em suspensão, devido à lipofilia inerente ao composto, característica química que pode limitar a sua absorção nos fluidos gastrintestinais bem como sua biodisponibilidade oral (BETHUNE et al., 2011; HURST et al., 2007, JAMBHEKAR; BREEN, 2013). As substâncias administradas em solução aquosa são mais rapidamente absorvidas do que aquelas em suspensão, porque se misturam de forma mais efetiva com a fase aquosa do local absorptivo, podendo exercer substancial efeito sobre a eficácia e a toxicidade de um composto (KHADKA et al., 2014). Então, a fim de aumentar a hidrossolubilidade e a estabilidade do PTS, além obter um perfil farmacocinético mais favorável para determinar a dose de PTS efetiva, optamos em produzir uma formulação utilizando a HP β CD como veículo.

Neste estudo, o complexo PTS:HP β CD foi preparado por método em solução de acordo com Yeo et al., (2013). Mediante aos ensaios de caracterização do complexo obtido, verificamos a presença de interações entre as moléculas de PTS e HP β CD, sugerindo que a metodologia de complexação foi efetiva. Adicionalmente, mostramos pela primeira vez que a complexação com PTS pode ser confirmada usando a técnica de ressonância magnética nuclear (homonuclear 2D-ROESY ^1H), por meio da interação entre o hidrogênio H_a presente no anel aromático (anel A) do PTS com o hidrogênio (H_5) presente no interior da cavidade da HP β CD. Foi possível verificar que a complexação com HP β CD aumentou a solubilidade do PTS cerca de 7000 vezes quando comparado ao PTS não complexado (em suspensão) (BETHUNE et al., 2011). Há relatos de que o aumento da hidrossolubilidade por complexação com ciclodextrina quadriplica a biodisponibilidade oral do PTS, aumentando sua concentração sérica e exposição tecidual, efeitos decorrentes da melhoria da absorção e saturação de mecanismos de eliminação hepática (CHOO et al., 2014; YEO et al., 2013). Embora a farmacocinética não tenha sido foco deste estudo, é importante conhecer o comportamento cinético do PTS no organismo para identificar a dose terapêutica, assim como risco de toxicidade.

Verificamos que a complexação não altera a capacidade antioxidante do PTS *in vitro*, e demonstra potencial antioxidante nos modelos *in vivo* aqui utilizados. Nossos resultados deixam claro que a dose mais alta testada (100 mg/kg) exerceu a maioria dos efeitos terapêuticos no fígado de ratos hígidos e no coração de ratos com insuficiência cardíaca (IC) e, que esta mesma dose parece não induzir efeitos tóxicos. Estas conclusões podem ser suportadas pela capacidade em aumentar antioxidantes não enzimáticos, reduzir a concentração de EROs totais e lipoperoxidação no fígado dos ratos. Corroborando nossos resultados, outros autores também destacam o efeito antioxidante do PTS no fígado de ratos (EL-SAYED et al., 2015; ACHARYA; GHASKADBI, 2013; PARI; SATHEESH, 2006).

Poucos estudos avaliam os efeitos terapêuticos do PTS complexado a ciclodextrinas no coração, o que nos motivou a explorar diferentes vias sensíveis ao estado redox envolvidas com remodelamento mal adaptativo e progressão para IC, tanto no coração direito quanto no esquerdo. Neste contexto, utilizamos os modelos de remodelamento ventricular: na IC direita, causada por sobrecarga de pressão/volume (secundário a HAP); e ventricular na IC esquerda, devido à perda de tecido contrátil, causada por IAM.

O complexo PTS:HP β CD também reduziu a hipertrofia do VD e a dilatação VE, demonstrando efeitos benéficos deste tratamento no remodelamento ventricular. Evidências mostram que o PTS inibe a proliferação e crescimento de células musculares, eventos que estão relacionados ao desenvolvimento da hipertrofia (MCCORMACK; MCFADDEN, 2013; PARK et al., 2010). Neste estudo, verificamos que o PTS preservou a função sistólica evidenciado mediante avaliação ecocardiográfica. Houve aumento da variação de área percentual entre a diástole e a sístole final pela administração do PTS, tanto no ventrículo direito quanto no esquerdo, sendo esta variação descrita pela FAC, indicando melhora na função sistólica (LANG et al., 2015). Similarmente, o estilbeno resveratrol previne a hipertrofia e a disfunção sistólica esquerda em ratos hipertensos, efeitos atribuídos a redução de estresse oxidativo (THANDAPILLY et al., 2010). Por outro lado, as respostas específicas oriundas do VD ou VE em nosso protocolo experimental, podem ser decorrentes em parte, de características inerentes a cada ventrículo, embora, em nível celular, as respostas moleculares de remodelação (matriz extracelular e do citoesqueleto) de ambos ventrículos sejam em grande parte similares (REDDY; BERNSTEIN, 2015). Por exemplo, o VD e o VE diferem em sua carga de trabalho e, portanto, em suas necessidades energéticas e metabolismo mitocondrial. Com

base apenas na pós-carga ventricular, a carga de trabalho do VE é 5 vezes maior que o VD, devido à maior resistência vascular sistêmica comparada com o leito vascular pulmonar de baixa resistência (FRIEDBERG; REDINGTON, 2014). No estado patológico, embora haja aumento na produção de ROS em ambos ventrículos, o VD é mais suscetível ao estresse oxidativo do que o VE. Isto ocorre porque no VD as defesas antioxidantes fracassam mais precocemente, enquanto no VE permanecem intactas até um estágio mais avançado de falência (TSUTSUI et al., 2001; REDDY; BERNSTEIN, 2015). De forma conjunta, essas diferenças poderiam explicar a especificidade das respostas encontradas em cada um dos ventrículos sob condições de remodelamento patológico.

De fato, ao compararmos o impacto do complexo PTS:HP β CD nos desenhos experimentais aqui utilizados, encontramos alguns efeitos que foram comuns a ambos modelos. Dentre os efeitos comuns, mostramos que o complexo PTS:HP β CD reduziu a lipoperoxidação tanto no fígado quanto nos ventrículos direito e esquerdo. A oxidação de lipídeos ocorre pela perda de elétrons dos ácidos graxos polinsaturados da membrana celular para os radicais livres, formando radical peroxil (ROO \cdot) que é posteriormente convertido em malondialdeído, por meio de uma série de reações em cadeia, alterando a arquitetura da membrana celular e mitocondrial (FRANKEL, 1984). Adicionalmente, os produtos de oxidação lipídica formam complexos que inativam proteínas, desencadeiam apoptose induzida pela via mitocondrial intrínseca, assim como medeiam a sinalização inflamatória (MCINTYRE; HAZEN, 2010). É importante notar que a lipoperoxidação contribui para o remodelamento cardíaco e acarreta disfunção ventricular (DUARTE et al., 2009). Similarmente ao nosso achado, recentes pesquisas fornecem evidências da habilidade do PTS para proteger células cardíacas e mitocôndrias hepáticas isoladas contra lipoperoxidação (ACHARYA; GHASKADBI, 2013; LIU et al., 2017; YU et al., 2017). Semelhante ao α -tocoferol, a capacidade antioxidante do PTS frente à lipoperoxidação pode ser facilitada pela sua característica lipossolúvel, que permite facilmente sua difusão pela membrana plasmática celular, local onde as reações de oxidação de lipídeos ocorrem com notável frequência (TAPPEL, 1962).

De forma agregada, outro importante contribuinte para o potencial terapêutico do complexo PTS:HP β CD sobre o remodelamento ventricular, comum tanto ao VD quanto ao VE, está centrado na modulação de enzimas tóxicas antioxidantes, como GST e GRx. Nossos resultados indicam que o complexo PTS:HP β CD estimulou a atividade da GST, uma transferase que catalisa a conjugação de GSH para uma variedade de compostos

eletrofilicos e substratos tóxicos, a qual promove desintoxicação celular e contribui de forma significativa para a manutenção do equilíbrio redox e sobrevivência celular (RÖTH et al., 2011; WU et al., 2004). Similar ao nosso resultado Ghazali e cols. (2013) e Satheesh, Pari (2006) também observaram aumento na atividade da GST após tratamento com PTS tanto em culturas de células hepáticas, quanto em tecidos renal e hepático, respectivamente. É importante ressaltar que a inibição da GST em cardiomiócitos submetidos à injúria oxidativa, resulta em apoptose por meio da ativação das proteínas da via MAP cinase (RÖTH et al., 2011). Interessantemente, detectamos que o complexo PTS:HP β CD modulou a atividade da GRx nos ventrículos de forma oposta, ou seja, aumentou a atividade da GRx no VD que foi reduzida pela *Cor pulmonale*, enquanto que no VE sua atividade foi reduzida. Esta resposta paradoxal pode estar relacionada à concentração de agentes estressores (EROs), ao estresse submetido e à ativação de sistema antioxidante específico nos diferentes ventrículos (LUSHCHAK, 2014). De fato, a HAP induzida pela MCT é considerada a forma mais agressiva da doença em modelos animais, tendo o estresse oxidativo como um importante mecanismo patológico (DUMITRASCU et al., 2008; SINGAL et al., 2004). De forma agregada, VD é mais sensível ao estresse oxidativo do que o VE, devido à falha precoce do seu sistema antioxidante (TSUTSUI et al., 2001; REDDY; BERNSTEIN, 2015). Dessa forma, o efeito estimulatório do PTS sobre a atividade da GRx, parece ser um importante mecanismo para minimizar os danos do estresse oxidativo neste tecido. Por outro lado, a administração do complexo PTS:HP β CD no VE intensificou a atividade enzimática de outros tiosis, (como TRx e GST), a fim de recompor a homeostase do cardiomiócito e, restabeleceu em níveis basais a atividade da GRx. Então, supomos que devido a ação antioxidante do PTS, não foi necessária a ação do sistema da GRx, sendo a sua atividade poupada no VE.

Ao observarmos em conjunto os resultados obtidos no VD, concluímos que complexo PTS:HP β CD apresenta habilidade antioxidante multialvo, dose dependente, evidenciadas pela capacidade de manter o ambiente intracelular mais reduzido, pela redução da lipoperoxidação e do estresse oxidativo. Estes efeitos podem ser decorrentes da baixa produção de ânion superóxido dependente de NADPH oxidase, associada a ativação do sistema da glutathiona pelo aumento de disponibilidade de GSH e modulação da sua reciclagem. Concomitantemente, o complexo PTS:HP β CD estimulou o sistema antioxidante enzimático, através das enzimas SOD, GST e GRx. A inibição de NADPH oxidase pela administração do PTS é benéfica porque reduz a concentração de ânion

superóxido, uma espécie altamente produzida durante a hipertrofia do VD, que poderá originar outras EROs e contribuir para o dano tecidual e disfunção ventricular (KURODA; SADOSHIMA, 2010). O aumento intracelular de ânion superóxido origina altas concentrações de peróxido de hidrogênio, uma espécie com capacidade de inativar a SOD (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A melhora na atividade da SOD pode ser decorrente da capacidade redutora do PTS que transfere elétrons da sua hidroxila fenólica aos radicais livres (PERRON; BRUMAGHIM, 2009). Além disso, a disponibilidade de GSH elimina EROs e protege proteínas contra a oxidação e degradação proteasomal (forma dissulfetos com o grupamento tiol das proteínas) e ainda contribui para a eficiência antioxidante das enzimas GPx, GST e GRx (HANSCHMANN et al., 2013; LUSHCHAK, 2012; NAGARAJAN et al., 2017). É importante ressaltar que a integridade deste sistema é fundamental para a sobrevivência de células cardíacas e, a ineficiência destas enzimas resulta em apoptose de cardiomiócitos (RÖTH et al., 2011; GALLOGLY et al., 2010). Assim, a modulação destes tióis pelo resalta o potencial terapêutico deste fitofenol sobre o remodelamento ventricular direito. Adicionalmente, houve aumento da sinalização para o relaxamento do VD, favorecendo a contratilidade. Ambos mecanismos parecem prevenir a hipertrofia da parede livre do VD, resultando em proteção da função sistólica, melhora do volume sistólico e débito cardíaco.

Ao analisarmos os efeitos farmacológicos do complexo PTS:HP β CD sobre o VE pós IAM, verificamos que o sistema da glutatona não foi alterado, fato que nos surpreendeu por se tratar do antioxidante intracelular mais abundante, diferentemente do que foi observado no VD. Por outro lado, no VE o complexo PTS:HP β CD reduziu a lipoperoxidação, aumentou a atividade da GST assim como preservou a atividade da TRxR. Estas modulações preveniram a dilatação da câmara esquerda restabelecendo a função sistólica. Corroborando nosso resultado, outros autores também evidenciaram que o PTS exerce efeito positivo sobre atividade da GST, reduz a lipoperoxidação e o estresse oxidativo (PARI; SATHEESH, 2006; LIU et al., 2017). Embora, outros estudos também reportem que a administração do PTS produz efeitos cardioprotetores em miocárdio isquêmico (YU et al., 2017; LIU et al., 2017), este estudo é pioneiro em descrever que o complexo PTS:HP β CD aumenta a expressão de Nrf2 e da GSK-3 β fosforilada em cardiomiócitos pós IAM, mecanismo que parece contribuir para o efeito antioxidante e cardioprotetor deste fitoquímico. Neste contexto, o mecanismo citoprotetor do PTS também pode ser relacionada a regulação da resposta antioxidante, através da síntese de antioxidantes por ativação transcricional de Nrf2 (Bhakkiyalakshmi et al., 2014; Elango

et al., 2014). Adicionalmente, a inibição de GSK-3 β tem sido reportada como uma promissora terapia na recuperação da lesão miocárdica por isquemia/reperfusão, já que esta intervenção reduz a área de infarto e promove cardioproteção (MIURA et al., 2009). Adicionalmente, Yadav e cols. (2010) sugerem que a administração de inibidores de GSK-3 β potencializa os efeitos cardioprotetores do pré-condicionamento isquêmico em ratos diabéticos. Além disso, há relatos de que GSK-3 β fosforilada, além de inibir a sinalização apoptótica, pode inativar a degradação de Nrf2, favorecendo seu direcionamento para o núcleo celular, regulando positivamente a resposta antioxidante (ROJO et al., 2008).

Na figura 4 pode-se observar um resumo esquemático do potencial farmacológico do complexo PTS:HP β CD em diferentes alvos.

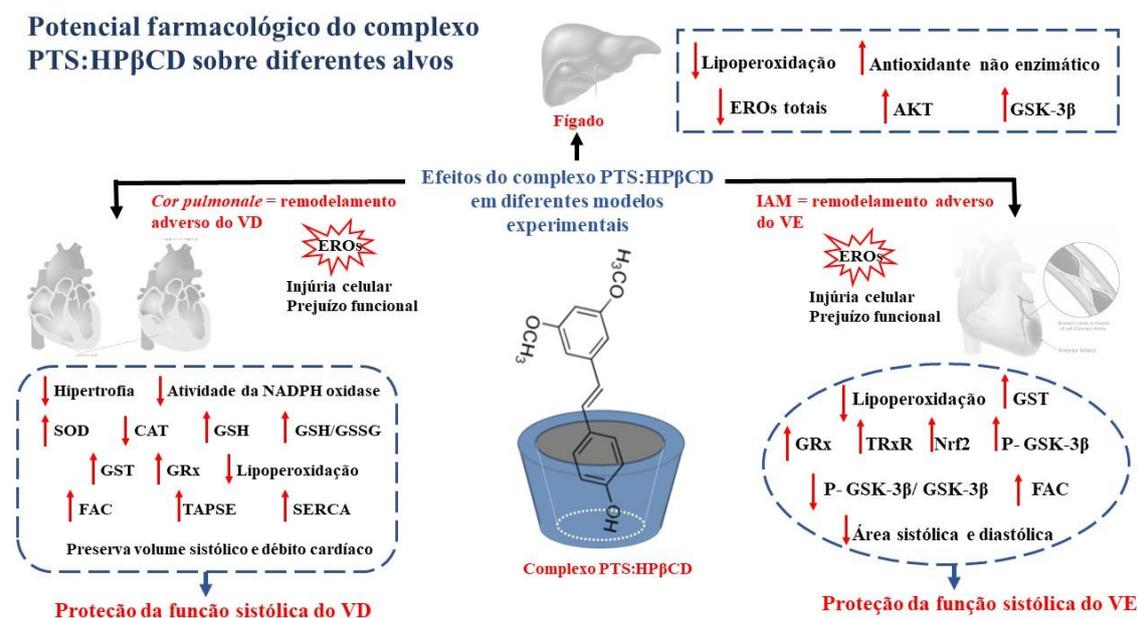


Figura 4: Potencial farmacológico do complexo PTS:HP β CD em diferentes alvos. AKT: serina/treonina quinase; CAT: catalase; EROs: espécies reativas de oxigênio; FAC: variação de área fracional; GSK-3 β : glicogênio sintase quinase 3 β ; GRx: glutaredoxina; GSH: reduzida da glutatona; GSSG: glutatona oxidada; GST: glutatona-S-transferase; HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; IAM: infarto agudo do miocárdio; Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; SERCA: proteína cálcio ATPase; SOD: superóxido dismutase; TAPSE: excursão sistólica do plano do anel da tricúspide; TRxR: tioredoxina redutase; VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo. ↑: aumento; ↓: redução.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na presente tese nosso foco inicial foi explorar os efeitos do complexo PTS:HP β CD sobre o remodelamento do VD, desta forma apresentamos mais resultados abordando diferentes mecanismos fisiopatológicos em modelo de *Cor pulmonale* comparado ao modelo de IAM. Uma justificativa plausível seria o fato do mecanismo de remodelamento e IC direita ser pouco estudada, apresentar-se como uma doença muito debilitante, com mau prognóstico e opções terapêuticas limitadas. Assim como no VD, os efeitos do PTS sobre o VE pós IAM são muito promissores, sendo novas investigações necessárias para identificar outros alvos farmacológicos deste fitoquímico durante a progressão e remodelamento pós IAM.

De forma geral, o conjunto de resultados da presente Tese destaca o papel antioxidante do complexo PTS:HP β CD, especialmente na dose de 100 mg/kg, e sua modulação sobre a expressão proteínas de sinalização redox sensíveis tanto no no fígado quanto em ambos os ventrículos sob condições de remodelamento patológico. Adicionalmente, estes achados reforçam outros dados da literatura que apontam a participação de mecanismos de estresse na fisiopatologia desta doença. As ações cardioprotetoras do complexo PTS:HP β CD parecem prevenir o remodelamento ventricular e melhoram a função sistólica direita e esquerda, efeitos que provavelmente foram favorecidos pelo aumento da biodisponibilidade oral promovido pela presença da HP β CD no complexo. Diante disso, o complexo PTS:HP β CD poderia ser usado como um tratamento complementar a terapia farmacológica disponível a fim de minimizar os efeitos deletérios do desequilíbrio oxidativo sobre a homeostase e função cardíaca.

7. PERSPECTIVAS

Embora os resultados apontem para o potencial antioxidantes do PTS, outros alvos farmacológicos carecem ser explorados, tais como:

- ✓ Determinar o efeito do tratamento com do complexo PTS:HP β CD sobre parâmetros inflamatórios, como interleucina 10 (IL-10) e interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), proteína de choque térmico Hsp 70 e fator nuclear kappa B (NF- κ B) sobre o remodelamento em *Cor pulmonale* e pós IAM;

- ✓ Explorar o efeito do tratamento com o complexo PTS:HP β CD sobre a sinalização apoptótica, através da expressão das proteínas Bcl2, Bax e caspase em ambos os modelos estudados na presente Tese;
- ✓ Investigar se a administração do complexo PTS:HP β CD terá algum efeito sobre a autofagia tanto no VD quanto no VE, através da expressão das proteínas fosfoinositol-3-cinase (PI3K), beclina 1, proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR);
- ✓ Avaliar a biodisponibilidade oral e tecidual (Fígado, VD e VE) do complexo PTS:HP β CD comparado ao PTS não complexado.
- ✓ Avaliar o efeito do complexo PTS:HP β CD quando co-administrado com fármacos já utilizados na clínica que constem nas diretrizes de tratamento da insuficiência cardíaca, como por exemplo, a associação com inibidor da fosfodiesterase 5 (o sildenafil) durante a *Cor pulmonale* experimental; e em modelo de IAM a administração concomitante com um betabloqueador (como metropolol) ou com um bloqueador do receptor de angiotensina (como losartana).

8. REFERÊNCIAS

ABBATE, Antonio; NARULA, Jagat. Role of apoptosis in adverse ventricular remodeling. Abbate A1, Narula J. **Heart Failure Clinics**, Virginia, v. 1, n. 8, p.79-86, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hfc.2011.08.010>.

A CLERK,. The radical balance between life and death. **Journal Of Molecular And Cellular Cardiology**, [s.l.], v. 35, n. 6, p.599-602, 1 jun. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2828\(03\)00121-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2828(03)00121-4).

ACHARYA, Jhankar D; GHASKADBI, Saroj S. Protective effect of Pterostilbene against free radical mediated oxidative damage. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.10-11, 26 set. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-13-238>.

ADMINISTRATION, Food And Drug. **Guidance for industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070246.pdf>>. Acesso em: 1 dez. 2017.

AEBI, Hugo. [13] Catalase in vitro. **Methods In Enzymology**, [s.l.], p.121-126, 1984. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3).

AGO, Tetsuro et al. A Redox-Dependent Pathway for Regulating Class II HDACs and Cardiac Hypertrophy. **Cell**, [s.l.], v. 133, n. 6, p.978-993, jun. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.041>.

AKERBOOM, Theodorus P.m.; SIES, Helmut. [48] Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods In Enzymology**, [s.l.], p.373-382, 1981. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(81\)77050-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(81)77050-2).

AKSENOV, Michael Y.; MARKESBERY, William R.. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, [s.l.], v. 302, n. 2-3, p.141-145, abr. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3940\(01\)01636-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3940(01)01636-6).

ANAND, Inder S. et al. Noninvasive assessment of left ventricular remodeling: Concepts, techniques, and implications for clinical trials. **Journal Of Cardiac Failure**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.452-464, dez. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1054/jcaf.2002.129286>.

ANDERSON, Mary E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Glutamate, Glutamine, Glutathione, And Related Compounds**, [s.l.], p.548-555, 1985. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(85\)13073-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(85)13073-9).

ANZAI, Toshihisa. Inflammatory Mechanisms of Cardiovascular Remodeling. **Circulation Journal**, [s.l.], v. 82, n. 3, p.629-635, 2018. Japanese Circulation Society. <http://dx.doi.org/10.1253/circj.cj-18-0063>.

AZEVEDO, Paula S. et al. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s.l.], p.62-69, 2016. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/abc.20160005>.

BAVARESCO L, Fregoni C, Cantú E, et al. Stilbene compounds: from the grapevine to wine. *Drugs Exp Clin Res.* 25 (2-3): 57-63, 1999.

BELHAJ, Asmae et al. Heme Oxygenase-1 and Inflammation in Experimental Right Ventricular Failure on Prolonged Overcirculation-Induced Pulmonary Hypertension. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 7, p.69-70, 25 jul. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069470>.

BELLÓ-KLEIN, Adriane et al. Oxidative Stress and Antioxidant Strategies in Cardiovascular Disease. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [s.l.], v. 2014, p.1-2, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/678741>.

BERLINER, Dominik; BAUERSACHS, Johann. Current Drug Therapy in Chronic Heart Failure: the New Guidelines of the European Society of Cardiology (ESC). **Korean Circulation Journal**, [s.l.], v. 47, n. 5, p.543-554, 2017. The Korean Society of Cardiology (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.4070/kcj.2017.0030>

BETHUNE, Sarah J.; SCHULTHEISS, Nate; HENCK, Jan-olav. Improving the Poor Aqueous Solubility of Nutraceutical Compound Pterostilbene through Cocrystal Formation. **Crystal Growth & Design**, [s.l.], v. 11, n. 7, p.2817-2823, 6 jul. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cg1016092>

BHAKKIYALAKSHMI, Elango et al. Pterostilbene-mediated Nrf2 activation: Mechanistic insights on Keap1. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 24, n. 16, p.3378-3386, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.011>.

BHAKKIYALAKSHMI, Elango et al. Therapeutic potential of pterostilbene against pancreatic beta-cell apoptosis mediated through Nrf2. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 171, n. 7, p.1747-1757, 18 mar. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.12577>.

BLUME, Herning.; SCHUG, Barbara. Biopharmaceutical characterisation of herbal medicinal products: are in vivo studies necessary?. **European Journal Of Drug Metabolism And Pharmacokinetics**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.41-48, mar. 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf03190057>.

BOCCHI, EA et al. Atualização da diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica - 2012. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo , v. 98, n. 1, supl. 1, p. 1-33, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2012000700001>.

BRENNAN, Jonathan P. et al. Oxidant-induced Activation of Type I Protein Kinase A Is Mediated by RI Subunit Interprotein Disulfide Bond Formation. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 281, n. 31, p.21827-21836, 5 jun. 2006. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m603952200>.

BURCHFIELD, J. S.; XIE, M.; HILL, J. A.. Pathological Ventricular Remodeling: Mechanisms. **Circulation**, [s.l.], v. 128, n. 4, p.388-400, 22 jul. 2013. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circulationaha.113.001878>.

BURGOYNE, J. R. et al. Cysteine Redox Sensor in PKGI α Enables Oxidant-Induced Activation. **Science**, [s.l.], v. 317, n. 5843, p.1393-1397, 7 set. 2007. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1144318>.

CASTRO, Alexandre Luz de et al. Cardioprotective effects of thyroid hormones in a rat model of myocardial infarction are associated with oxidative stress reduction. **Molecular And Cellular Endocrinology**, [s.l.], v. 391, n. 1-2, p.22-29, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2014.04.010>.

CHAN, O.helen; H.STEWART, Barbra. Physicochemical and drug-delivery considerations for oral drug bioavailability. **Drug Discovery Today**, Miami, v. 11, n. 1, p.461-473, 1996.

CHOO, Qiu-yi et al. Pterostilbene surpassed resveratrol for anti-inflammatory application: Potency consideration and pharmacokinetics perspective. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v. 11, p.352-362, nov. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.018>.

COHN, Jay N; FERRARI, Roberto; SHARPE, Norman. Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. **Journal Of The American College Of Cardiology**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.569-582, mar. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0735-1097\(99\)00630-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0735-1097(99)00630-0).

COLLINS, Mahlon A. et al. Total protein is an effective loading control for cerebrospinal fluid western blots. **Journal Of Neuroscience Methods**, [s.l.], v. 251, p.72-82, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.05.011>.

DAI, D.-f. et al. Mitochondrial Oxidative Stress Mediates Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy and G q Overexpression-Induced Heart Failure. **Circulation Research**, [s.l.], v. 108, n. 7, p.837-846, 10 fev. 2011. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.110.232306>.

DUARTE, Daniella R. et al. The role of oxidative stress and lipid peroxidation in ventricular remodeling induced by tobacco smoke exposure after myocardial infarction. **Clinics**, [s.l.], v. 64, n. 7, p.10-12, 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1807-59322009000700014>.

DUMITRASCU, Rio et al. Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury. **Bmc Pulmonary Medicine**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.62-69, dez. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2466-8-25>.

ELANGO, Bhakkiyalakshmi et al. Pterostilbene Ameliorates Streptozotocin-Induced Diabetes through Enhancing Antioxidant Signaling Pathways Mediated by Nrf2. **Chemical Research In Toxicology**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.47-57, 7 jan. 2016.

American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00378>.

EL-SAYED, El-sayed M.; MANSOUR, Ahmed M.; NADY, Mohamed E.. Protective Effects of Pterostilbene against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Rats. **Journal Of Biochemical And Molecular Toxicology**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.35-42, 9 set. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.21604>.

FLECHA, Beatriz Gonzalez; LLESUY, Susana; BOVERIS, Alberto. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.93-100, jan. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90002-k](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(91)90002-k).

FLOHÉ, Leopold; GÜNZLER, Wolfgang A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods In Enzymology**, [s.l.], p.114-120, 1984. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05015-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05015-1).

FRANGOIANNIS, Nikolaos G. Regulation of the Inflammatory Response in Cardiac Repair. **Circulation Research**, [s.l.], v. 110, n. 1, p.159-173, 5 jan. 2012. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.111.243162>.

FRIEDBERG, M. K.; REDINGTON, A. N. Right Versus Left Ventricular Failure: Differences, Similarities, and Interactions. **Circulation**, [s.l.], v. 129, n. 9, p.1033-1044, 3 mar. 2014. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circulationaha.113.001375>.

GAJARSA, Jason J.; KLONER, Robert A.. Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities. **Heart Failure Reviews**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.13-21, 10 jul. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10741-010-9181-7>.

GALLOGLY, Molly M. et al. Glutaredoxin Regulates Apoptosis in Cardiomyocytes via NFκB Targets Bcl-2 and Bcl-xL: Implications for Cardiac Aging. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s.l.], v. 12, n. 12, p.1339-1353, 15 jun. 2010. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2009.2791>.

GATICA, D. et al. Molecular Mechanisms of Autophagy in the Cardiovascular System. **Circulation Research**, [s.l.], v. 116, n. 3, p.456-467, 29 jan. 2015. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.114.303788>.

GOLDBERG, Lee R.. Heart failure. **Annals Of Internal Medicine**, Pensilvânia, v. 11, n. 152, p.1-15, 2010.

GUO, Yan et al. Restoration of sirt1 function by pterostilbene attenuates hypoxia-reoxygenation injury in cardiomyocytes. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 776, p.26-33, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.02.052>.

GURUSAMY, Narasimman; DAS, Dipak K.. Autophagy, Redox Signaling, and Ventricular Remodeling. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s.l.], v. 11, n. 8, p.1975-1988, ago. 2009. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2009.2524>.

GUTHENBERG, Claes; MANNERVIK, Bengt. Glutathione S-transferase (transferase π) from human placenta is identical or closely related to glutathione S-transferase (transferase ρ) from erythrocytes. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Enzymology**, [s.l.], v. 661, n. 2, p.255-260, out. 1981. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2744\(81\)90012-7](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2744(81)90012-7).

HALLIWEL, Barry; GUTTERIDGE, JMC. **Free Radical in Biology and Medicine**. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HALLIWEL, Barry; GUTTERIDGE, JMC. **Free Radical in Biology and Medicine**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HANSCHMANN, Eva-maria et al. Thioredoxins, Glutaredoxins, and Peroxiredoxins—Molecular Mechanisms and Health Significance: from Cofactors to Antioxidants to Redox Signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s.l.], v. 19, n. 13, p.1539-1605, nov. 2013. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2012.4599>.

HOLMGREN, Arne; ASLUND, Fredrik. [29] Glutaredoxin. **Methods In Enzymology**, [s.l.], p.283-292, 1995. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)52031-7](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(95)52031-7).

HOLMGREN, Arne; BJORNSTEDT, Mikael. [21] Thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods In Enzymology**, [s.l.], p.199-208, 1995. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)52023-6](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(95)52023-6).

HÖRTER, D.; DRESSMAN, J.b.. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.3-14, abr. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x\(96\)00487-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x(96)00487-5).

HU, L. W. et al. Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling. **American Journal Of Physiology-regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, [s.l.], v. 285, n. 6, p.1473-1480, dez. 2003. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00269.2003>.

Hu, M. Commentary: Bioavailability of Flavonoids and Polyphenols: Call to Arms. Molecular HU, Ming. Commentary: Bioavailability of Flavonoids and Polyphenols. **Molecular Pharmaceutics**, [s.l.], v. 4, n. 6, p.803-806, dez. 2007. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/mp7001363>.

HU, Ming. Commentary: Bioavailability of Flavonoids and Polyphenols. **Molecular Pharmaceutics**, [s.l.], v. 4, n. 6, p.803-806, dez. 2007. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/mp7001363>.

JAMBHEKAR, Sunil S.; BREEN, Philip J.. Drug dissolution: significance of physicochemical properties and physiological conditions. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 18, n. 23-24, p.1173-1184, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2013.08.013>.

JONES, Dean P.. Radical-free biology of oxidative stress. **American Journal Of Physiology-cell Physiology**, [s.l.], v. 295, n. 4, p.849-868, out. 2008. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00283.2008>.

JOHNS, Thomas N. P.; OLSON, Byron J.. Experimental Myocardial Infarction: I. A Method of Coronary Occlusion in Small Animals. **Annals Of Surgery**, [s.l.], v. 5, n. 140, p.675-682, 1954.

KAPETANOVIC IM, Muzzio M. Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. **Cancer Chemother Pharmacol** 68(3): 593-601, 2011.

KASIOTIS, Konstantinos M. et al. Resveratrol and related stilbenes: Their anti-aging and anti-angiogenic properties. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 61, p.112-120, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.038>.

KEMP, Clinton D.; CONTE, John V.. The pathophysiology of heart failure. **Cardiovascular Pathology**, [s.l.], v. 21, n. 5, p.365-371, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carpath.2011.11.007>.

KHADKA, Prakash et al. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. **Asian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 9, n. 6, p.304-316, dez. 2014. Elsevier BV.

KONSTAM, Marvin A. et al. Left Ventricular Remodeling in Heart Failure. **Jacc: Cardiovascular Imaging**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.98-108, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcmg.2010.10.008>.

KOSURU, Ramoji et al. Promising therapeutic potential of pterostilbene and its mechanistic insight based on preclinical evidence. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 789, p.229-243, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.07.046>.

KURODA, J. et al. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 107, n. 35, p.15565-15570, 16 ago. 2010. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1002178107>.

KURODA, Junya; SADOSHIMA, Junichi. NADPH Oxidase and Cardiac Failure. **Journal Of Cardiovascular Translational Research**, [s.l.], v. 3, n. 4, p.314-320, 31 mar. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12265-010-9184-8>.

LAEMMLI, Ulrich Karl. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [s.l.], v. 227, n. 15, p.680-685, 1970.

LANG, Roberto M. et al. Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. **Journal Of The American Society Of Echocardiography**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.1-39, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.echo.2014.10.003>.

LAVANDERO, Sergio et al. Autophagy in cardiovascular biology. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 125, n. 1, p.55-64, 2 jan. 2015. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci73943>.

LEHNART, Stephan E.; MAIER, Lars S.; HASENFUSS, Gerd. Abnormalities of calcium metabolism and myocardial contractility depression in the failing heart. *Heart Failure Reviews*, [s.l.], v. 14, n. 4, p.213-224, 12 maio 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10741-009-9146-x>.

LIN, Hai-shu; YUE, Bing-de; HO, Paul C.. Determination of pterostilbene in rat plasma by a simple HPLC-UV method and its application in pre-clinical pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, [s.l.], v. 23, n. 12, p.1308-1315, dez. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bmc.1254>.

LIN, Jiunn H.; LU, Anthony Y. H.. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. **Pharmacological Reviews**, Pennsylvania, v. 4, n. 49, p.403-449, 1997.

LISSI, Eduardo; PASCUAL, Carlos; CASTILLO, Maria D. del. Luminol Luminescence Induced by 2,2'-Azo-Bis(2-Amidinopropane) Thermolysis. **Free Radical Research Communications**, [s.l.], v. 17, n. 5, p.299-311, jan. 1992. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/10715769209079523>.

LIU, Feng et al. Pterostilbene protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via activating eNOS in diabetic rats. **International Journal Of Clinical And Experimental Medicine**, [s.l.], v. 2, n. 10, p.2550-2557, 2017.

LOFTSSON, Thorsteinn; BREWSTER, Marcus E.. Cyclodextrins as Functional Excipients: Methods to Enhance Complexation Efficiency. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 101, n. 9, p.3019-3032, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.23077>.

LÓPEZ-NICOLÁS, José Manuel et al. Physicochemical Study of the Complexation of Pterostilbene by Natural and Modified Cyclodextrins. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 57, n. 12, p.5294-5300, 24 jun. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf900285e>.

LOWRY, Oliver Howe et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 1, n. 193, p.265-275, 1951.

LOU, H.; DANELISEN, I.; SINGAL, P. K.. Involvement of mitogen-activated protein kinases in adriamycin-induced cardiomyopathy. *American Journal Of Physiology-heart And Circulatory Physiology*, [s.l.], v. 288, n. 4, p.1925-1930, abr. 2005. **American Physiological Society**. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.01054.2004>.

LUSHCHAK, Volodymyr I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 153, n. 2, p.175-190, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.10.004>.

LUSHCHAK, Volodymyr I.. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], v. 224, p.164-175, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>.

LUSHCHAK, Volodymyr I.. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. **Journal Of Amino Acids**, [s.l.], v. 2012, p.1-26, 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/736837>.

LV, Min et al. Pterostilbene attenuates the inflammatory reaction induced by ischemia/reperfusion in rat heart. **Molecular Medicine Reports**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.724-728, 21 out. 2014. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2014.2719>.

MANACH, Claudine et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, [s.l.], v. 81, n. 1, p.230-242, 1 jan. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/81.1.230s>.

MCCORMACK, Denise; MCFADDEN, David. A Review of Pterostilbene Antioxidant Activity and Disease Modification. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [s.l.], v. 2013, p.1-15, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/575482>.

MCCORMACK, Denise; MCFADDEN, David. Pterostilbene and Cancer: Current Review. **Journal Of Surgical Research**, [s.l.], v. 173, n. 2, p.53-61, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2011.09.054>.

MCINTYRE, T. M.; HAZEN, S. L.. Lipid Oxidation and Cardiovascular Disease: Introduction to a Review Series. **Circulation Research**, [s.l.], v. 107, n. 10, p.1167-1169, 11 nov. 2010. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.110.224618>.

MCLAUGHLIN, V. V.; DAVIS, M.; CORNWELL, W. Pulmonary Arterial Hypertension. **Current Problems in Cardiology**. v. 36, n. 12, p. 461–517, 2011.

MANNERVIK, Bengt; GUTHENBERG, Claes. Glutathione transferase (human placenta). **Methods In Enzymology**, [s.l.], p.231-235, 1981. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(81\)77030-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(81)77030-7).

MARKLUND, Stefan. **Handbook of Methods for Oxygen Radical Research**: Pyrogallol autoxidation. Boca Raton: Greenwald Ra, 1985. 243 p.

MIURA, Tetsuji; NISHIHARA, Masahiro; MIKI, Takayuki. Drug Development Targeting the Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β)-Mediated Signal Transduction Pathway: Role of GSK-3 β in Myocardial Protection Against Ischemia/Reperfusion Injury. **Journal Of Pharmacological Sciences**, [s.l.], v. 109, n. 2, p.162-167, 2009. Japanese Pharmacological Society. <http://dx.doi.org/10.1254/jphs.08r27fm>.

MONOSTORI, Péter et al. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review. **Journal Of Chromatography B**, [s.l.], v. 877, n. 28, p.3331-3346, out. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.06.016>.

MOSCAT, Jorge; DIAZ-MECO, Maria T.. P62 at the Crossroads of Autophagy, Apoptosis, and Cancer. **Cell**, [s.l.], v. 137, n. 6, p.1001-1004, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.023>

NAGARAJAN, Narayani; OKA, Shinichi; SADOSHIMA, Junichi. Modulation of signaling mechanisms in the heart by thioredoxin 1. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 109, p.125-131, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.020>.

NIKI, Etsuo. Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress ?. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 595, p.19-24, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2015.11.017>.

NORTON, Gavin R et al. Heart failure in pressure overload hypertrophy. **Journal Of The American College Of Cardiology**, [s.l.], v. 39, n. 4, p.664-671, fev. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0735-1097\(01\)01792-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0735-1097(01)01792-2).

NOZAWA, E. et al. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, [s.l.], v. 39, n. 5, p.687-695, maio 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-879x2006000500016>.

OHKAWA, Hiroshi; OHISHI, Nobuko; YAGI, Kunio. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 95, n. 2, p.351-358, jun. 1979. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).

PARI, L.; SATHEESH, M. Amarnath. Effect of pterostilbene on hepatic key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin- and nicotinamide-induced diabetic rats. **Life Sciences**, [s.l.], v. 79, n. 7, p.641-645, jul. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2006.02.036>.

PARK, Eun-seok et al. Pterostilbene, a natural dimethylated analog of resveratrol, inhibits rat aortic vascular smooth muscle cell proliferation by blocking Akt-dependent pathway. **Vascular Pharmacology**, [s.l.], v. 53, n. 1-2, p.61-67, jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2010.04.001>.

PAUL, S. et al. Anti-inflammatory Action of Pterostilbene Is Mediated through the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Colon Cancer Cells. **Cancer Prevention Research**, [s.l.], v. 2, n. 7, p.650-657, 23 jun. 2009. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.capr-08-0224>.

PENG, Ru-min et al. Oral delivery system enhanced the bioavailability of stilbenes: Resveratrol and pterostilbene. **Biofactors**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.5-15, jan. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/biof.1405>.

PERRON, Nathan R.; BRUMAGHIM, Julia L.. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. **Cell Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 53, n. 2, p.75-100, 28 jan. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12013-009-9043-x>.

Pterostilbene. Monograph. *Altern Med Rev*, [s.l.], v. 15, n. 1, p.159-163, 2010.

PINHO, Eva et al. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 101, p.121-135, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.078>.

RABABA'H, Abeer M. et al. Oxidative Stress and Cardiac Remodeling: An Updated Edge. **Current Cardiology Reviews**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.53-59, 14 mar. 2018. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1573403x14666180111145207>.

REDDY, Sushma; BERNSTEIN, Daniel. Molecular Mechanisms of Right Ventricular Failure. **Circulation**, [s.l.], v. 132, n. 18, p.1734-1742, 2 nov. 2015. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circulationaha.114.012975>.

REIS FILHO, José Rosino de Araújo R. et al. Reverse Cardiac Remodeling: A Marker of Better Prognosis in Heart Failure. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s.l.], p.502-506, 2015. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/abc.20150025>.

REMSBERG, Connie M. et al. Pharmacometrics of pterostilbene: preclinical pharmacokinetics and metabolism, anticancer, antiinflammatory, antioxidant and analgesic activity. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 22, n. 2, p.169-179, 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.2277>.

REZNICK, Abraham Z.; PACKER, Lester. [38] Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods In Enzymology**, [s.l.], p.357-363, 1994. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(94\)33041-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(94)33041-7).

RICHE, Daniel M. et al. Analysis of Safety from a Human Clinical Trial with Pterostilbene. **Journal Of Toxicology**, [s.l.], v. 2013, p.1-5, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/463595>.

RICHE, Daniel M. et al. Pterostilbene on Metabolic Parameters: A Randomized, Double-Blind, and Placebo-Controlled Trial. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2014, p.1-8, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/459165>.

RIMANDO, Agnes M. et al. Resveratrol, Pterostilbene, and Piceatannol in Vaccinium Berries. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 52, n. 15, p.4713-4719, jul. 2004. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf040095e>.

RIVIÈRE, Céline; PAWLUS, Alison D.; MÉRILLON, Jean-michel. Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. **Natural Product Reports**, [s.l.], v. 29, n. 11, p.1317-1333, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c2np20049j>.

ROHIGHAZALI, Ahmad et al. Effects of Pterostilbene on O-deethylation and Glutathione Conjugation of Drug Metabolizing Enzyme Activities. **Pharmacologia**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.456-461, 2013.

ROJO, Ana I.; SAGARRA, María Rosa de; CUADRADO, Antonio. GSK-3 β down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. **Journal Of Neurochemistry**, [s.l.], v. 105, n. 1, p.192-202, abr. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05124.x>.

RÖTH, Eduard et al. Effect of a glutathione S-transferase inhibitor on oxidative stress and ischemia-reperfusion-induced apoptotic signalling of cultured cardiomyocytes. **Experimental & Clinical Cardiology**, [s.l.], v. 3, n. 16, p.92-96, 2011

RUIZ, M. J. et al. Dietary Administration of High Doses of Pterostilbene and Quercetin to Mice Is Not Toxic. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 57, n. 8, p.3180-3186, 22 abr. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf803579e>.

SANTOS, Celio X.c. et al. Redox signaling in cardiac myocytes. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 50, n. 7, p.777-793, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.003>.

SATHEESH, M. Amarnath; PARI, L.. The antioxidant role of pterostilbene in streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetes mellitus in Wistar rats. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, [s.l.], v. 58, n. 11, p.1483-1490, nov. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1211/jpp.58.11.0009>.

SAVARESE, Gianluigi; LUND, Lars H. Global Public Health Burden of Heart Failure. **Cardiac Failure Review**, [s.l.], v. 03, n. 01, p.7-10, 2017. **Medical Media Communications**, Ltd. T/A Radcliffe Cardiology. <http://dx.doi.org/10.15420/cfr.2016:25:2>.

SAVARESE, Gianluigi; LUND, Lars H. Global Public Health Burden of Heart Failure. **Cardiac Failure Review**, [s.l.], v. 03, n. 01, p.7-10, 2017. Medical Media Communications, Ltd. T/A Radcliffe Cardiology. <http://dx.doi.org/10.15420/cfr.2016:25:2>.

SCHENKEL, Paulo Cavalheiro et al. Redox-sensitive prosurvival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats. **Molecular And Cellular Biochemistry**, [s.l.], v. 341, n. 1-2, p.1-8, 30 mar. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-010-0431-8>.

SCHIEBER, Michael; CHANDEL, Navdeep s.. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. **Current Biology**, [s.l.], v. 24, n. 10, p.453-462, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>.

SCHIRONE, Leonardo et al. A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [s.l.], v. 2017, p.1-16, 2017. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/3920195>.

SHAH, A M. Free radicals and redox signalling in cardiovascular disease. **Heart**, [s.l.], v. 90, n. 5, p.486-487, 1 maio 2004. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/hrt.2003.029389>.

SHARGEL, L; Andrew, Y. Nonlinear pharmacokinetics. **In Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics**. Stanford, Connecticut, 1999, p. 444-474

SHIOMI, T.. Overexpression of Glutathione Peroxidase Prevents Left Ventricular Remodeling and Failure After Myocardial Infarction in Mice. **Circulation**, [s.l.], v. 109, n. 4, p.544-549, 26 jan. 2004. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/01.cir.0000109701.77059.e9>.

SIES, Helmut. Oxidative Stress: Introductory Remarks. **Oxidative Stress**, [s.l.], p.1-8, 1985. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-642760-8.50005-3>.

SOUZA-RABBO, Maristela P et al. Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. **Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology**, [s.l.], v. 35, n. 8, p.944-948, ago. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.04936.x>.

SZEJTLI, József. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 98, n. 5, p.1743-1754, jul. 1998. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr970022c>.

TAKIMOTO, E.; KASS, D. A.. Role of Oxidative Stress in Cardiac Hypertrophy and Remodeling. **Hypertension**, [s.l.], v. 49, n. 2, p.241-248, 26 dez. 2006. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/01.hyp.0000254415.31362.a7>.

TAO, L et al. Thioredoxin reduces post-ischemic myocardial apoptosis by reducing oxidative/nitrative stress. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 149, n. 3, p.311-318, out. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0706853>.

TAPPEL, A.I.. Vitamin E as the Biological Lipid Antioxidant. **Vitamins & Hormones**, [s.l.], p.493-510, 1962. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0083-6729\(08\)60732-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0083-6729(08)60732-3).

TAVARES, Angela Maria Vicente et al. Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction. **Life Sciences**, [s.l.], v. 87, n. 23-26, p.699-706, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2010.10.008>

TEIXEIRA, Rayane Brinck et al. Long-term T3 and T4 treatment as an alternative to aerobic exercise training in improving cardiac function post-myocardial infarction. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 95, p.965-973, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.021>.

THANDAPILLY, S. J. et al. Resveratrol Prevents the Development of Pathological Cardiac Hypertrophy and Contractile Dysfunction in the SHR Without Lowering Blood Pressure. **American Journal Of Hypertension**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.192-196, 1 fev. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1038/ajh.2009.228>.

TRACHOOTHAM, Dunyaporn et al. Redox Regulation of Cell Survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s.l.], v. 10, n. 8, p.1343-1374, ago. 2008. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2007.1957>.

TSUTSUI, Hiroyuki; KINUGAWA, Shintaro; MATSUSHIMA, Shouji. Oxidative stress and heart failure. **American Journal Of Physiology-heart And Circulatory Physiology**, [s.l.], v. 301, n. 6, p.2181-2190, dez. 2011. American Physiological Society.

VANEMPEL, V et al. Myocyte apoptosis in heart failure. **Cardiovascular Research**, [s.l.], v. 67, n. 1, p.21-29, 1 jul. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.04.012>.

VASCONCELOS, Sandra Mary Lima et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, [s.l.], v. 30, n. 5, p.1323-1338, out. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000500046>.

WANG, Wei et al. Pterostilbene and allopurinol reduce fructose-induced podocyte oxidative stress and inflammation via microRNA-377. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 83, p.214-226, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.029>.

WHELAN, Russell S.; KAPLINSKIY, Vladimir; KITSIS, Richard N.. Cell Death in the Pathogenesis of Heart Disease: Mechanisms and Significance. **Annual Review Of Physiology**, [s.l.], v. 72, n. 1, p.19-44, 17 mar. 2010. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163111>.

WILLIAMSON, Gary; MANACH, Claudine. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, [s.l.], v. 81, n. 1, p.243-255, 1 jan. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/81.1.243s>.

WINTERBOURN, Christine C.; HAMPTON, Mark B.. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 45, n. 5, p.549-561, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004>.

WU M et al.. Protective Effects of Pterostilbene Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. **Inflammation**. 2017 Apr;40(2):578-588. doi: 10.1007/s10753-016-0504-2.

WU, Guoyao et al. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. **The Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 134, n. 3, p.489-492, 1 mar. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jn/134.3.489>.

WU, Miao et al. Protective Effects of Pterostilbene Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. **Inflammation**, [s.l.], v. 40, n. 2, p.578-588, 4 jan. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-016-0504-2>.

XU, Le et al. Activation of the Cardiac Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) by Poly-S-Nitrosylation. **Science**, [s.l.], v. 279, n. 5348, p.234-237, 9 jan. 1998. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.279.5348.234>.

YADAV, Harlokesh Narayan; SINGH, Manjeet; SHARMA, P. L.. Involvement of GSK-3 β in attenuation of the cardioprotective effect of ischemic preconditioning in diabetic rat heart. **Molecular And Cellular Biochemistry**, [s.l.], v. 343, n. 1-2, p.75-81, 30 maio 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-010-0500-z>.

YEO, Samuel Chao Ming; HO, Paul C.; LIN, Hai-shu. Pharmacokinetics of pterostilbene in Sprague-Dawley rats: The impacts of aqueous solubility, fasting, dose escalation, and dosing route on bioavailability. **Molecular Nutrition & Food Research**, [s.l.], v. 57, n. 6, p.1015-1025, 18 fev. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201200651>.

YU, Zhaoxia et al. Pterostilbene protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via suppressing oxidative/nitrative stress and inflammatory response. **International Immunopharmacology**, [s.l.], v. 43, p.7-15, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2016.11.018>.

ZHANG, Jixiang et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [s.l.], v. 2016, p.1-18, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4350965>.

ZHU, Hongxin et al. Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 117, n. 7, p.1782-1793, 2 jul. 2007. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci27523>.

ZIAEIAN, Boback; FONAROW, Gregg C.. Epidemiology and aetiology of heart failure. **Nature Reviews Cardiology**, [s.l.], v. 13, n. 6, p.368-378, 3 mar. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2016.25>.

9. ANEXO

Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA - UFRGS



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 28218

Título: AVALIACAO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E ANTI-INFLAMATORIAS DO PTEROSTILBENO NO MODELO EXPERIMENTAL DE INSUFICIENCIA CARDIACA DIREITA

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ALEX SANDER DA ROSA ARAUJO - coordenador desde 01/02/2015

Denise dos Santos Lacerda - Aluno de Doutorado desde 01/02/2015

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 23/03/2015 - Sala 330 - Prédio do Anexo I da Reitoria - Campus Centro - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 172 ratos Wistar, machos, pesando 250 g, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 1 de Abril de 2015

CRISTIANE MATTE

Vice Coordenador da comissão de ética