

**ESTÁGIO PRÉ CLÍNICO DA HIPERTENSÃO PULMONAR ALTERA A
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DIAGRAMÁTICA SEM ALTERAR A
MUSCULATURA PERIFÉRICA**

ANDRÉ CASANOVA DE OLIVEIRA

**ESTÁGIO PRÉ CLÍNICO DA HIPERTENSÃO PULMONAR ALTERA A CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE DIAGRAMÁTICA SEM ALTERAR A MUSCULATURA PERIFÉRICA**

ANDRÉ CASANOVA DE OLIVEIRA

Dissertação de Mestrado apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Fisiopatologia Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Francis Lopes Pacagnelli

612.042
O48e

Oliveira, André Casanova de.

Estágio pré clínico da hipertensão pulmonar altera a capacidade antioxidante diafragmática sem alterar a musculatura periférica / André Casanova de Oliveira. – Presidente Prudente, 2017.
62 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,
Presidente Prudente, SP, 2017.

Bibliografia.

Orientador: Francis Lopes Pacagnelli.

1. Estresse Oxidativo. 2. Hipertensão arterial pulmonar. 3. Diafragma. I. Título.

ANDRÉ CASANOVA DE OLIVEIRA

**ESTÁGIO PRÉ CLÍNICO DA HIPERTENSÃO PULMONAR ALTERA A
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DIAGRAGMÁTICA SEM ALTERAR A
MUSCULATURA PERIFÉRICA**

Dissertação de Mestrado apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Presidente Prudente, 28 de agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Francis Lopes Pacagnelli
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof^a. Dr^a. Camila Renata Corrêa
Universidade Paulista Julio de Mesquita Filho – Unesp
Botucatu-SP

Prof^a. Dr^a. Rosa Maria Barilli Nogueira
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

Ao meus pais Adilson de Oliveira e Marilene Casanova de Oliveira pelo apoio incondicional em todos os momentos não só desta jornada, mas de toda a vida. Por todo o incentivo, paciência, ajuda e amor. Por não me deixar desistir diante dos obstáculos e dificuldades da vida.

Ao meus irmãos, Alexandre Casanova de Oliveira, Marcelo Casanova de Oliveira e Mariliza Casanova de Oliveira pelo amor e companheirismo de sempre.

À minha família que sempre me apoiou e esteve ao meu lado.

À minha orientadora Profa. Dra. Francis Lopes Pacagnelli, por todo conhecimento compartilhado, por sempre incentivar o estudo, direcionando da melhor forma a busca do saber, pelas oportunidades ofertadas de crescimento profissional e pessoal e todo carinho e dedicação. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus que me capacitou, acolheu, ajudou e abençoou nesta jornada.

À minha família que sempre esteve presente, apoiando e acreditando na minha capacidade pessoal e profissional.

A todos os amigos e pacientes que sempre torceram pelo meu sucesso profissional.

Aos Docentes Profa. Dra. Camila Correa, Prof. Dr. Katashi Okoshie Prof. Dr. Antônio Carlos Cicogna, que colaboraram para a realização deste trabalho.

A Ana Karenina Dias de Almeida Sabela, Thaoan Mariano por toda ajuda na parte experimental, vocês foram fundamentais para que o trabalho fosse concretizado.

Aos colegas Dr. Dijon pelo apoio, conhecimento e por toda ajuda na parte experimental deste trabalho.

Aos colegas do Mestrado Ciência Animal e profissionais da UNOESTE de Presidente Prudente e da UNESP de Botucatu, que ajudaram de alguma forma, com trabalhos, conhecimentos e até mesmo torcendo pelo término deste trabalho.

Aos Docentes do Mestrado que compartilharam todo conhecimentos que possuem de forma exemplar, contribuindo com a minha formação profissional.

À UNOESTE, pela oportunidade do Mestrado, bem como toda a sua equipe de profissionais, que tornam esta universidade um lugar de respeito e exemplo a ser seguido.

À Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, que deu todo apoio científico e tecnológico para a realização deste Mestrado.

À minha orientadora Profa. Dra. Francis Lopes Pacagnelli, que dedicou mais do que o seu tempo livre, abrindo outras oportunidades profissionais, e que é referência não só do saber científico, como também de ética, respeito e profissionalismo. Saiba que sou grato pela oportunidade que me proporcionou e um exemplo para seguir na carreira científica e acadêmica. Obrigada!

A todos os meus sinceros agradecimentos!

“ A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens mas em ter novos olhos”.

(Marcel Proust)

LISTA DE ABREVIÇÕES

ANOVA: Análise de variância

AT: átrios

C: Grupo Controle

DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica

EDL: Extensor longo dos dedos

g: Gramas

HCl: Ácido Clorídrico

HP: Grupo Hipertensão

HP: Hipertensão pulmonar

hrs: horas

IC: Insuficiência cardíaca

km/h: quilômetro por hora

MCT: Monocrotalina

MDA: Malonaldeído

mg/kg: miligrama por quilo

MHZ: megahertz

min: minutos

mmol/L: milimol por litro

ms: milissegundo

NaCl 9%: solução salina

NaOH: Hidróxido de sódio

°C: graus célsio

TAC Pulm: Tempo de aceleração da artéria pulmonar

TAP: Porcentagem antioxidante Total

TEJPulm: Tempo de ejeção VD

VD: Ventrículo direito

VE: Ventrículo esquerdo

VMÁXPulm: velocidade da artéria pulmonar

μm^2 : micrômetro quadrado

RESUMO

Estágio Pré Clínico Da Hipertensão Pulmonar Altera a Capacidade Antioxidante Diagramática sem Alterar a Musculatura Periférica

Hipertensão Pulmonar (HP) é uma doença grave com evolução para a insuficiência cardíaca, visto que, nesta fase final, ocorrem alterações musculares periféricas, dentre elas, modificações do estresse oxidativo. Entretanto, não há conhecimento se, na fase inicial da HP, estágio pré clínico, com disfunção cardíaca ocorra alterações do estresse oxidativo. O objetivo desse estudo foi avaliar os indicadores produtos malonaldeído (MDA) e capacidade antioxidante hidrofílica (CAH) e o estresse oxidativo dos músculos periféricos e respiratório de ratos com hipertensão pulmonar no estágio pré clínico, de disfunção cardíaca sem insuficiência cardíaca (IC). Este estudo foi aprovado previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição promotora (protocolo 2883). Foram utilizados dezesseis ratos Wistar machos, com 2 meses de idade e peso médio de $206 \pm 16,35\text{g}$, e a HP foi induzida pela aplicação de dose única intraperitoneal de monocrotalina (60mg/kg). Os animais foram divididos em 2 grupos com 8 animais: controle (C) e grupo com disfunção cardíaca devido a hipertensão pulmonar (HP). Após 3 semanas da aplicação de monocrotalina os animais foram avaliados por ecocardiograma para comprovação da disfunção cardíaca. Após este período os animais foram sacrificados e os músculos EDL(extensor longo dos dedos), sóleo e diafragma foram congelados. Para análise do estresse oxidativo na musculatura esquelética foi realizada a avaliação da porcentagem da capacidade antioxidante hidrofílica e do Malonaldeído (MDA). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro Wilk e a comparação entre os grupos por teste t não pareado ou Mann Whitney. Foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$. Ao ecocardiograma houve diminuição da velocidade máxima da artéria pulmonar e do tempo de aceleração da artéria pulmonar, o que comprova disfunção cardíaca. Houve aumento da capacidade antioxidante hidrofílica do diafragma (grupo C: $35,84 \pm 5,99\%$ e grupo HP: $42,12 \pm 5,19\%$, $p=0,0490$), sem alterar os músculos periféricos (Sóleo grupo C: $41,49 \pm 2,45\%$ vs. Grupo HP $45,06 \pm 4,66\%$, $p=0,06$); (EDL grupo C: $35,76 \pm 6,98\%$ e grupo HP: $33,91 \pm 6,56\%$, $p= 0,36$); Não houve alterações entre os músculos no MDA. No estágio pré clínico da HP já há aumento da capacidade antioxidante do diafragma sem piora dos músculos periféricos. Isso indica ativação de um mecanismo de defesa precoce apenas na musculatura respiratória. Outros marcadores de alterações musculares periféricas necessitam ser estudados para melhor compreensão dos mecanismos e propostas de tratamento precoce.

Palavras Chave: Estresse Oxidativo, Hipertensão arterial pulmonar, Diafragma

ABSTRACT

Pre-Clinical Stage of Pulmonary Hypertension Modifies Diaphragm Antioxidant Capacity Without Altering Peripheral Skeletal Muscle

Pulmonary hypertension (PH) is a serious disease that progress to heart failure (HF) and may increase the generation of reactive oxygen species in skeletal muscle. However, it is not known whether if changes in oxidative stress occur in the initial phase of PH (pre-clinical stage). We examined the oxidative stress of peripheral and respiratory muscles in rats with PH in the pre-clinical stage. PH was induced by a single intraperitoneal injection of monocrotaline (60mg/Kg). The animals were divided into two groups: control (C, n=8) and PH (n=8). After three weeks the animals were submitted to an echocardiogram to check cardiac dysfunction and were sacrificed. We evaluated oxidative stress (antioxidant capacity and malonaldehyde) in the extensor digitorum longus (EDL), soleus and diaphragm muscles. The echocardiogram showed a decrease in the maximum velocity of the pulmonary artery and the time of acceleration of the pulmonary artery, which proves cardiac dysfunction. There was an increase in the antioxidant capacity of the diaphragm (C group: $35.84 \pm 5.99\%$ and HP group: $42.12 \pm 5.19\%$, $P=0.0490$), without alterations in the peripheral muscles (Soleus in the C group: $41.49 \pm 2.45\%$ vs. HP group $45.06 \pm 4.66\%$, $p=0.06$); (EDL in the C group: $35.76 \pm 6.98\%$ and HP group: $33.91 \pm 6.56\%$, $p= 0.36$). There were no changes in the malonaldehyde muscles. In the pre-clinical stage of PH, there is an increase in the antioxidant capacity of the diaphragm without alter of the peripheral muscles. This finding indicates activation of an early defense mechanism in the respiratory muscles only.

Keywords: diaphragm, oxidative stress, pulmonary arterial hypertension, skeletal muscle.

SUMÁRIO

1	ARTIGO ORIGINAL.....	12
	ANEXO 1 - APROVAÇÃO ÉTICA.....	42
	ANEXO 2 – NORMAS DA REVISTA INTERNATIONAL JOURNAL EXPERIMENTAL PATHOLOGY.....	44
	ANEXO 3 - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO À REVISTA.....	61

1 ARTIGO ORIGINAL

ESTÁGIO PRÉ CLÍNICO DA HIPERTENSÃO PULMONAR ALTERA A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DIAGRAMÁTICA SEM ALTERAR A MUSCULATURA PERIFÉRICA

André Casanova de Oliveira*, Ana Karenina Dias de Almeida Sabela*, Dijon Salomé Campos Sales‡, Thaoan Bruno Mariano*, Fabiane ValentiniFrancisqueti‡, KatashiOkoshi‡, Camila Renata Corrêa‡, Antônio Carlos Cicogna‡, Flavia Alessandra Guarnier§, Francis Lopes Pacagnelli†

*Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

‡Departamento de Clínica Médica, Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho, (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

§Laboratório de Fisiopatologia das Adaptações Musculares, Departamentode Patologia Geral, UniversidadeEstadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil.

†Departamentode Fisioterapia, Universidadedo Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

Correspondência:

Francis Lopes Pacagnelli

Universidade do Oeste Paulista -Unoeste – Presidente Prudente

Rua Osvaldo Paixão 444 CEP: 19.050-920

Telefone: (018) 3229-1000

RESUMO

INTRODUÇÃO: Hipertensão Pulmonar (HP) é uma doença grave com evolução para a insuficiência cardíaca, visto que, nesta fase final, ocorrem alterações musculares periféricas, dentre elas, modificações do estresse oxidativo. Entretanto, não há conhecimento se, na fase inicial da HP, estágio pré clínico, com disfunção cardíaca ocorra alterações do estresse oxidativo. **OBJETIVO:** Avaliar o estresse oxidativo dos músculos periféricos e respiratório de ratos com hipertensão pulmonar no estágio pré clínico, de disfunção cardíaca sem insuficiência cardíaca. **MÉTODOS:** Este estudo foi aprovado previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição promotora (protocolo 2883). Foram utilizados dezesseis ratos Wistar machos, com 2 meses de idade e peso médio de $206 \pm 16,35\text{g}$, e a HP foi induzida pela aplicação de dose única intraperitoneal de monocrotalina (60mg/kg). Os animais foram divididos em 2 grupos com 8 animais: controle (C) e grupo com disfunção cardíaca devido a hipertensão pulmonar (HP). Após 3 semanas da aplicação de monocrotalina os animais foram avaliados por ecocardiograma para comprovação da disfunção cardíaca. Após este período os animais foram sacrificados e os músculos EDL(extensor longo dos dedos), sóleo e diafragma foram congelados. Para análise do estresse oxidativo na musculatura esquelética foi realizada a avaliação da porcentagem da capacidade antioxidante hidrofílica e do Malonaldeído (MDA). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro Wilk e a comparação entre os grupos por teste t não pareado ou Mann Whitney. Foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$. **RESULTADOS:** Ao ecocardiograma houve diminuição da velocidade máxima da artéria pulmonar e do tempo de aceleração da artéria pulmonar, o que comprova disfunção cardíaca. Houve aumento da capacidade antioxidante do diafragma (grupo C: $35,84 \pm 5,99\%$ e grupo HP: $42,12 \pm 5,19\%$, $p=0,0490$), sem alterar os músculos periféricos (Sóleo grupo C: $41,49 \pm 2,45\%$ vs. Grupo HP $45,06 \pm 4,66\%$, $p=0,06$); (EDL grupo C: $35,76 \pm 6,98\%$ e grupo HP: $33,91 \pm 6,56\%$, $p= 0,36$); Não houve alterações entre os músculos no MDA. **CONCLUSÃO:** No estágio pré clínico da HP já há aumento da capacidade antioxidante do diafragma sem piora dos músculos periféricos. Isso indica ativação de um mecanismo de defesa precoce apenas na musculatura respiratória. Outros marcadores de alterações musculares periféricas necessitam ser estudados para melhor compreensão dos mecanismos e propostas de tratamento precoce.

Palavras Chave: Estresse Oxidativo, Hipertensão arterial pulmonar, Diafragma

INTRODUÇÃO

A Hipertensão Pulmonar (HP) é uma doença progressiva grave, com altas taxas de mortalidade que ocasiona disfunção ventricular, posterior insuficiência cardíaca e morte (Roos-Hesselink & Zijlstra 2011; Voelke *et al.* 2012; Hoepfer *et al.* 2013). Na fase inicial da HP há o remodelamento cardíaco patológico ocasionado hipertrofia ventricular direita sem sinais e sintomas, essa é a fase de disfunção cardíaca (estágio pré clínico) (de Jesus Perez 2016; Guignabert *et al.* 2015). Uma das anormalidades fisiopatológicas importantes na HAP na fase de IC é a disfunção da musculatura respiratória e periférica (Panagiotou *et al.* 2015). Essas alterações musculares promovem dispnéia e fadiga que implica na redução da capacidade de exercício e piora da qualidade de vida (Panagiotou *et al.* 2015; Morris *et al.* 2017).

Um dos fatores que contribuem para as alterações musculares periféricas e respiratória na HP é o estresse oxidativo, que ocorre por desequilíbrio entre os sistemas oxidante e antioxidante. Na HP o aumento do estresse oxidativo ocorre na fase mais tardia, ou seja, na fase de IC. (Doggrell & Brown 1996; Singa *et al.* 2000; Barst *et al.* 2004; Farahmand *et al.* 2004). As espécies reativas de oxigênio promovem modificações nas proteínas, metabolismo e contratilidade muscular ocasionando grande impacto funcional (Jackson 2009; Breda *et al.* 2014). Essas alterações estão bem esclarecidas na musculatura esquelética na fase de IC, entretanto, no estágio pré clínico da doença, de disfunção cardíaca na HP não há estudos que avaliem essas alterações (Martinez *et al.* 2005; Souza-Rabbo *et al.* 2008).

Outro aspecto importante é que a musculatura respiratória pode ser acometida antes da musculatura periférica, uma vez que seu recrutamento é mais intenso,

o que pode gerar sobrecarga metabólica e consequente adaptação desse músculo (Himoriet *al*, 2017). Estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o músculo diafragma se adapta de forma diferente da musculatura periférica em animais com HP que já evoluíram para IC, nos aspectos relacionados à expressão de fatores miogênicos (Lopes *et al* 2008; Bertaglia *et al*. 2011). Entretanto, para nosso conhecimento não há estudos que avaliem o estresse oxidativo no estágio pré clínico de hipertensão pulmonar, na transição entre disfunção ventricular direita para insuficiência cardíaca. A identificação precoce dos mecanismos envolvidos nas alterações dos músculos periféricos e respiratório na HP é de grande relevância uma vez que estratégias terapêuticas podem ser desenvolvidas de forma direcionada e contribuam para amenizar ou impedir o agravamento da doença e suas incapacidades funcionais.

A hipótese deste estudo é que no estágio pré clínico, de disfunção cardíaca já ocorra prejuízos na musculatura respiratória, antes da periférica. O objetivo deste estudo foi avaliar o estresse oxidativo dos músculos periféricos e diafragma de ratos com hipertensão pulmonar na fase de disfunção cardíaca (estágio pré clínico).

MÉTODOS

Animais

Para realização desse estudo foram utilizados dezesseis ratos norvegicus Wistar machos, com 2 meses de idade e peso médio de $206 \pm 16,35$ g provenientes do Biotério Central da Universidade do Oeste Paulista –

UNOESTE de Presidente Prudente – São Paulo. Foram mantidos no Laboratório de Experimentação Animal da mesma instituição em caixas plásticas com dimensão 41x34x16 cm (3 animais/caixa), à temperatura de 21 à 23°C e umidade relativa do ar de 50% a 60%, com ciclos de luminosidade de 12h (claro /escuro) com início do ciclo claro as 7h. Os ratos receberam ração de forma controlada (Supralab, Alisul®, Brasil) e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em 2 grupos experimentais com 8 animais cada denominados: grupo controle (C), grupo Hipertensão Pulmonar (HP).

Cálculo Amostral

O tamanho da amostra foi calculado a priori. Para o cálculo da amostra foi utilizado o programa SigmaPlot 11.0, considerando-se um $\alpha=0,05$ e poder estatístico de 95% ($\beta=0,10$), constando assim uma amostra 16 ratos. A diferença mínima esperada entre as médias foi de 10%, considerando um desvio padrão de 10%. De acordo com resultados encontrados na literatura, entre os animais tratados com MCT, a taxa de mortalidade para o período de estudo, 4 semanas, gira em torno de 25%, então, nos grupos C e HP, ao tamanho amostral calculado foi acrescentado um animal (Henkenset *al.* 2007; Okadaet *al.* 2008; Souza- Rabboet *al.* 2008).

Aprovação Ética

Todos os protocolos experimentais que foram utilizados neste estudo estão em conformidade com os princípios de cuidados com animais de laboratório formulado pelo Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicado pelo *National Research Council* (NIH Publicação revisada em 2011). Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE (número 2883).

Indução da Hipertensão Pulmonar

O protocolo para indução da hipertensão pulmonar e disfunção ventricular direita foi realizado nos ratos do grupo HP, com injeção de uma única dose intraperitoneal da monocrotalina (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) na proporção 60mg/kg em 1mol/L em tampão HCl pH 7.0 com 1 mol/L de NaOH (Souza-Rabboet *al.* 2008; Pacagnelliet *al.* 2016). Nos animais do grupo C foi realizada administração intraperitoneal de solução salina (NaCl 0,9%), para que todos os animais fossem submetidos ao mesmo grau de estresse (Souza-Rabboet *al.* 2008; Pacagnelliet *al.* 2016).

Controle de Ração

A monocrotalina tem sido associada à redução do consumo alimentar. E para controlar esse efeito os ratos foram separados em gaiolas individuais para o controle diário do consumo de ração. Os ratos que receberam a monocrotalina (HP) receberam comida a vontade. Os ratos do grupo C receberam a mesma quantidade de ração que o Grupo HP consumiu no dia anterior (Lopes *et al.* 2008; Pacagnelli *et al.* 2016).

Desenho Experimental

Após 3 semanas da aplicação da monocrotalina os ratos foram avaliados por ecocardiografia para identificar disfunção ventricular direita. Após a avaliação ecocardiográfica, os animais foram pesados, eutanasiados com dose intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg kg^{-1}), e mortos por decaptação. O coração foi retirado, dissecado e pesados. Foram realizadas as avaliações anatômicas para comprovar disfunção ventricular.

Avaliação ecocardiográfica

Para avaliação ecocardiográfica, os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (60 mg kg^{-1} ; Dopalen®) e cloridrato de xilazina (0.5 mg kg^{-1} ; Anasedan®) via intraperitoneal. Para o exame ecocardiográfico o aparelho utilizado foi equipado com sonda multifrequência 5-11.5 MHz (General Electric Medical Systems, Vivid S6, TiratCarmel, Israel) (Pacagnelli *et al.* 2016). Os parâmetros avaliados para comprovar hipertensão pulmonar com conseqüente disfunção ventricular direita foram: tempo de aceleração pulmonar

(TAcPulm); velocidade da artéria pulmonar (VMáxPulm) e tempo de ejeção do VD (TEJ) (Eguchiet *al.* 2014; Pacagnelliet *al.* 2016).

Avaliação dos Parâmetros Anatômicos

O coração foi retirado, dissecado em átrios (AT), ventrículos direito (VD) e esquerdo+ septo ventricular (VE) e pesados. Os parâmetros anatômicos foram normalizados pelo peso corporal final (PCF) (AT/PCF, VD/PCF e VE/PCF) e foram utilizados como índice de atrofia. O pulmão e fígado também foram retirados, pesados, onde foram acondicionados em estufa por 48h. Após isso, foram pesados novamente para cálculo da relação peso úmido/peso seco que foi utilizado para avaliar se houve insuficiência cardíaca (Carvalhoet *al.* 2010).

Capacidade antioxidante hidrofílica (CAH)

A medida da capacidade antioxidante hidrofílica foi determinada fluorometricamente, em 200 ul de sobrenadante de tecido muscular congelado e homegenizado conforme descrita por Beretta *et al* (2006) utilizando leitor VICTOR X2 (Perkin Elmer –Boston, MA). A capacidade antioxidante foi quantificada por meio de comparação da área sobre a curva relativa à cinética de oxidação da suspensão fosfatidilcolina, o qual foi usado como referência de matriz biológica. O 2',2 Azobis (2- amino-propano)-dihidroclorado (AAPH) foi usado como iniciador de radical peroxil. Os resultados representam a porcentagem de inibição do (4,4-difluoro-5-(4-fenil 1-3 butadienil)-4-bora-3^a,4^a-diazs-indaceno-3-ácidoundecanóico (BODIPY) 581/591 no plasma com

relação ao que ocorreu na amostra controle do BODIPY 581/591 em lipossoma PC. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram apresentados em porcentagem de proteção.

Quantificação do Malonaldeído (MDA)

O MDA é resultante da degradação de lipídios poli-insaturado, sua produção é usada como biomarcador dos níveis de peroxidação lipídica. A sua avaliação foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Performance com detecção fluorométrica. Para essa análise, 150mg de cada tecido foram homogeneizados com 1mL de PBS gelado (pH=7,4) em ULTRA-TURRAX® T25 basic IKA® WerkeStaufen/Germany e centrifugado a 800g a 4°C por 10min. Uma alíquota de 100uL do sobrenadante, foi misturado com 500ml de ácido tricloroacético (TCA, 10% w/v) e 10ml de hidroxitoluenobutilado (BHT, 5% in EtOH) para interromper a peroxidação lipídica, misturado no vórtex e colocado a 95°C por 20 min. Após a incubação as amostras foram resfriadas por 5 min e centrifugado por 10 minutos a 14 000 rpm. O sobrenadante (103 ul) foi misturado com 50 ml de KOH (3.065 mol/l) e 650 ml de TBA (0.4% w/v em tampão acetato, pH 3.5), misturado no vórtex, incubado a 95°C por 45 min, resfriado por 5 min, filtrado (0.45mm) e acondicionado no sistema HPLC.

A concentração de TBARS foi calculada usando a curva padrão de MDA e foi expressa em nmol/mg de proteína (Nielsen *et al.* 1997).

O Resultado foi corrigido pela concentração de proteína total.

Análise Estatística

Para análise da normalidade foi utilizado o teste de Shapiro Wilk. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. Para comparação entre os dados anatômicos foi utilizado o teste t não pareado. Os dados referentes ao TAP e MDA foram avaliados pelo teste não paramétrico Mann Whitney. Foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$. O software utilizado foi o GraphPadPrism® (Graph-Pad Software, La Jolla, CA, USA).

RESULTADOS

Ecocardiograma

A avaliação ecocardiográfica do VD mostra que os animais que foram tratados com monocrotalina apresentavam disfunção ventricular direita caracterizada pela diminuição da velocidade máxima da artéria pulmonar (C= $88,6 \pm 4,98$ cm/s vs. HP= $68,75 \pm 19,34$ cm/s; $p=0,02$) e diminuição do tempo de aceleração da artéria pulmonar (C= $29,0 \pm 3,17$ ms vs. HP= $20,38 \pm 3,55$ ms; $p=0,0003$).

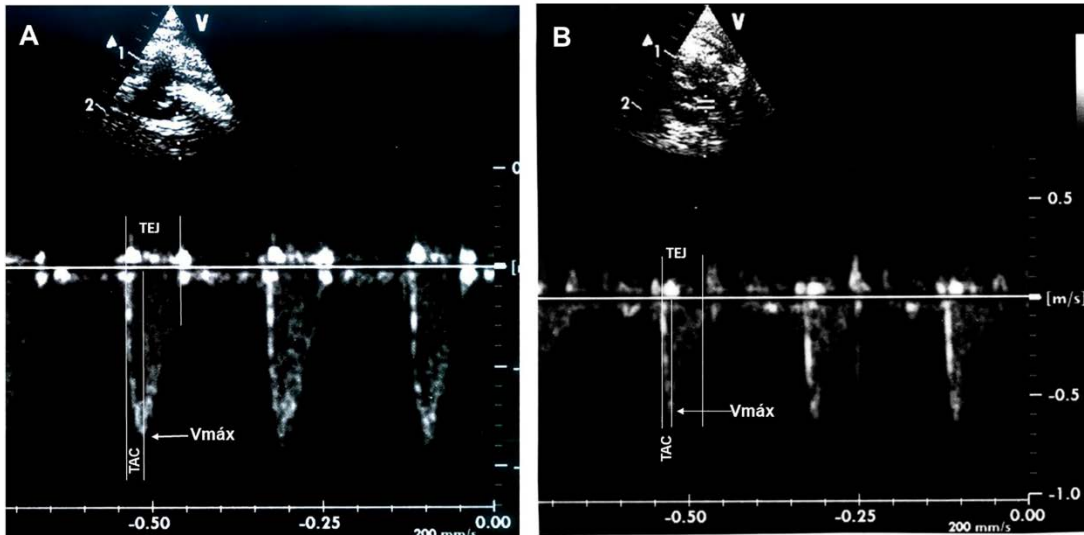


Figura 1. Imagens representativas do Ecocardiograma. Parâmetros pulmonares avaliados: tempo de aceleração pulmonar (TAcPulm); velocidade da artéria pulmonar (VMáxPulm) e tempo de ejeção do VD (TEJ). A. Grupo Controle: TAC= 26,6 ms; TEJ= 79,8 ms; Vmáx= 87 cm/s; B. Grupo Hipertensão Pulmonar: TAC= 17,1 ms; TEJ= 61,8 ms; Vmáx: 62 cm/s.

Parâmetros Anatômicos

A tabela 1 mostra os parâmetros anatômicos dos grupos C e HP. Após 2 semanas, os animais que receberam a monocrotalidado grupo HP apresentaram sinais de disfunção cardíaca no exame pós morte, tais como: hipertrofia atrial e ventricular direita sem derrame pleural e congestão hepática, comprovando que esses animais estavam em estágio pré clínico sem sinais de retenção hídrica que é característica da insuficiência cardíaca. Os animais dos grupos controles não apresentaram alterações. Não houve atrofia muscular.

Tabela 1. Dados anatômicos dos músculos expressos em média \pm desvio padrão, *p*-valor.

Variáveis	C	HP	<i>p</i> -valor
Peso Corporal Final			
(g)	404 \pm 30,47	377 \pm 66,47	0,34
Atrio (g)	0,081 \pm 16,48	1,28 \pm 0,49	0,04
VD (g)	0,18 \pm 0,02	0,29 \pm 0,08	0,006
VE (g)	0,75 \pm 0,04	0,70 \pm 0,09	0,23
ÁTRIO/PCT (mg/g)	0,22 \pm 0,03	0,36 \pm 0,16	0,048
VD/PCT (mg/g)	0,45 \pm 0,05	0,81 \pm 0,31	0,007
VE/PCT (mg/g)	1,86 \pm 0,07	1,87 \pm 0,12	0,54
Pulmão u/s (mg)	4,45 \pm 0,72	4,84 \pm 0,32	0,20
Fígado u/s (mg)	4,37 \pm 2,99	3,36 \pm 0,18	0,35
Soleo (g)	0,17 \pm 0,01	0,16 \pm 0,02	0,42
Sol/PCF (mg/g)	0,43 \pm 0,01	0,45 \pm 0,11	0,70
EDL (g)	0,16 \pm 0,03	0,15 \pm 0,05	0,32
EDL/PCF (mg/g)	0,39 \pm 0,06	0,40 \pm 0,09	0,81

C: Controle; HP: Hipertensão Pulmonar; PCT: peso corporal total; VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo; g: gramas. Sol: sóleo; EDL: extensor longo dos dedos. Teste t não pareado.

Capacidade antioxidante hidrofílica

Houve aumento da capacidade antioxidante do diafragma (grupo C:35,84 \pm 5,99% e grupo HP:42,12 \pm 5,19%, *p*=0,0490), sem alterar os músculos periféricos (Sóleo grupo C: 41,49 \pm 2,45% vs. Grupo HP: 45,06 \pm

4,66%, $p=0,06$); (EDL grupo C: $35,76 \pm 6,98\%$ e grupo HP: $33,91 \pm 6,56\%$, $p=0,36$);(Fig 2)

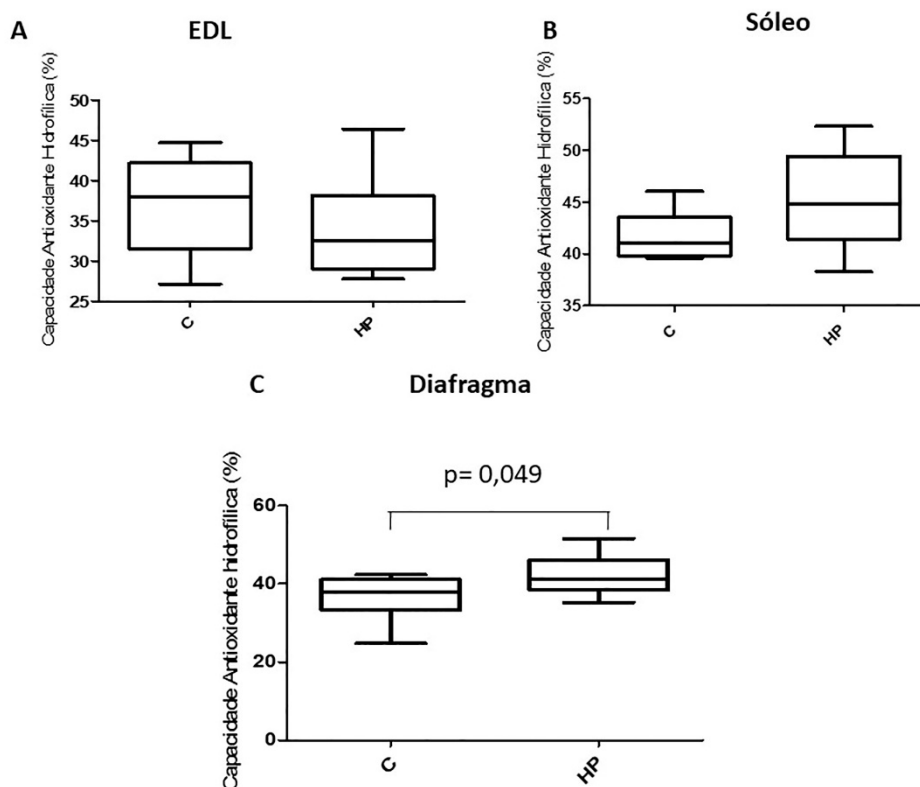


Figura 2. A.Capacidade antioxidante hidrofílica do músculo Extensor Longo dos Dedos (EDL). B.Capacidade antioxidante total do músculo SóleoC.Capacidade antioxidante total do músculo diafragma.C: grupo Controle; HP: grupo Hipertensão Pulmonar.

Quantificação do Malonaldeído (MDA)

Não houve alterações significantes nos músculos avaliados em relação aos valores de MDA na fase de disfunção cardíaca. Diafragma (Grupo C: $80,52 \pm 5,42$ HP: $70,83 \pm 14,55$ musculo EDL (Grupo C: $260,7 \pm 106,5$ HP: $124,2 \pm 41,89$ Solóo (Grupo C: $260,7 \pm 106,5$ Grupo HP: $166,6 \pm 99,79$) (Fig 2)

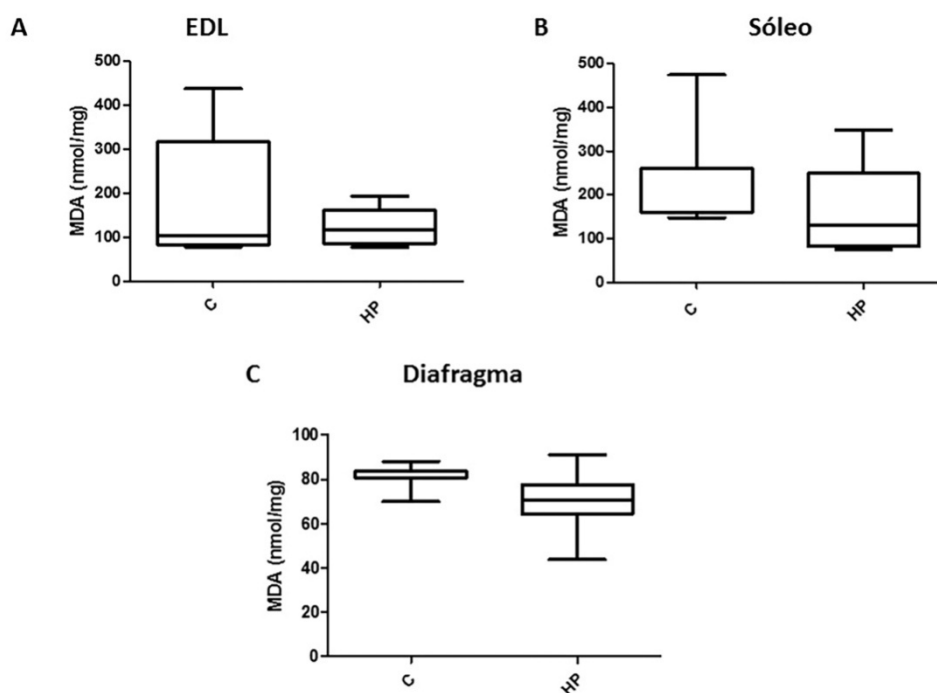


Figura 3. A. Dosagem do Malonaldeído no músculo Extensor Longo dos Dedos (EDL). **B.** Dosagem do Malonaldeído no músculo Sóleo **C.** Dosagem do Malonaldeído no músculo Diafragma. C: grupo Controle; HP: grupo Hipertensão Pulmonar.

Discussão

O principal achado desse estudo é que no estágio pré clínico da HP ocorre um estímulo da capacidade antioxidante da musculatura diafragmática que representa a porcentagem de proteção antioxidante, sem alterar a musculatura periférica. Não houve alteração do marcador MDA que representa a peroxidação lipídica na musculatura periférica e no diafragma.

Compreender os mecanismos envolvidos nessa doença principalmente em uma fase precoce de seu desenvolvimento é fundamental para abordagens terapêuticas sendo que essa inclui um amplo espectro de variedades. A HP é uma das classes de doenças que incluem hipertensão pulmonar idiopática, hipertensão pulmonar hereditária, hipertensão pulmonar desencadeada por toxinas e drogas, hipertensão pulmonar persistente do recém nascido além da hipertensão pulmonar associada a várias doenças como as doenças infecciosas, doenças congênitas cardíacas, anemias hemolíticas crônicas e doenças do tecido conjuntivo, entre outras. Além disso, a hipertensão pulmonar também está associada com doenças pulmonares que cursam com hipoxemia crônica como as fibroses e doença pulmonar obstrutiva crônica (Galieet *al.* 2009)

No presente estudo, os animais evoluíram para quadro de HP e disfunção do ventrículo direito (VD) (estágio pré clínico) sem IC como demonstrado pelas alterações ecocardiográficas, hipertrofia atriais e do VD, sem retenção hídrica, o que confirma a eficácia do modelo escolhido para promover a disfunção do VD (Pacagnelliet *al.* 2016).

A monocrotalina na dose de 60 ou 80 mg/Kg pode leva ao desenvolvimento da IC progressivamente e pode ser fatal entre 3-6 semanas (Hesselet *al.* 2006; Handokoet *al.* 2009; Colombo *et al.* 2013; Ruiteret *al.* 2013). Como o objetivo do nosso estudo era de avaliar na fase de disfunção cardíaca (pré clínica) os animais foram sacrificados com 3 semanas após a aplicação da monocrotalina.

Estudos mostram aumento do estresse oxidativo na IC, como o de Polidore *et al.* (2004) que encontraram um aumento dos níveis circulantes de

um marcador de peroxidação lipídica, bem como redução dos níveis séricos e atividade de elementos antioxidantes em pacientes com IC, quando comparados com pacientes sem IC. Os níveis do marcador de peroxidação lipídica foram maiores nos pacientes com classe funcional da doença mais avançada e estes se correlacionaram inversamente com os níveis de fração de ejeção (Weant *et al.* 2005; Lorgeril *et al.* 2001). Esse fato pode justificar nossos achados uma vez que as alterações na peroxidação lipídica pode estar relacionada com a fase mais avançada e grave da doença. Um dos motivos é que a fase inicial da doença, estágio pré clínico, em que ainda não há limitações funcionais importantes não tenha ocorrido ainda ativação de mediadores inflamatórios para acarretar uma resposta em relação ao aumento desse importante marcador do estresse oxidativo que é o MDA (Voelke *et al.* 1988; Bowers *et al.* 2004; Wong *et al.* 2013). No entanto, encontramos um aumento da capacidade antioxidante hidrofílica nos animais com HP, significando que alterações oxidativas podem estar ocorrendo e estimulando o sistema de defesa antioxidante. Juntamente com esses achados não houve atrofia muscular como foi demonstrado pela avaliação anatômica do sóleo e EDL, enfatizando que o sistema proteolítico muscular (proteossomal, calpaínas, entre outros) não foi ativado nessa fase inicial da doença. A peroxidação lipídica é uma consequência direta do estresse oxidativo e o MDA em concentrações normais provavelmente não ocasionou a degradação proteica dos músculos avaliados (Powers *et al.* 2010).

Estudos anteriores têm considerado modificações oxidativas como eventos iniciais para o desenvolvimento das alterações cardíacas e de massa muscular. Tonon *et al.* (2013a) demonstrou que o estresse oxidativo avaliado

pela peroxidação lipídica e capacidade antioxidante são alterados 60 dias depois da indução do enfisema por dose única de papaína, promovendo respostas proteolíticas na hipertrofia cardíaca. Além disso, alguns autores mostram que a peroxidação lipídica e a capacidade antioxidante são alteradas no músculo gastrocnêmio de ratos 60 dias após enfisema induzido por instilação de papaína, sem promover perda de massa muscular, proteólise (Tononet *et al.*, 2013b). Mattson *et al.*, (2002a, 2002b) demonstrou que o estresse oxidativo avaliado pelo aumento da peroxidação lipídica persiste durante estágios avançados do enfisema (180 dias), promovendo efeitos diretos sobre a composição de fibras musculares e na capacidade enzimática oxidante.

Modificações oxidativas no músculo esquelético em estágio mais avançado da insuficiência cardíaca têm sido relatadas e estes estão relacionados a atrofia (Bechara *et al.* 2014; Cunha *et al.* 2012). Entretanto, eventos relacionados as mudanças no perfil oxidativo durante o desenvolvimento dessa doença são pouco investigados. No presente estudo o modelo experimental utilizado avaliou o estágio inicial da doença (3^o semana) que progride ocasionando perda de massa muscular dos músculos periféricos, alterações da musculatura respiratória e conseqüente mortalidade precoce que ocorre em 6 semanas. (Handoko *et al.* 2008; Colombo *et al.* 2013; Ruitere *et al.* 2013). Embora não tenha ocorrido atrofia muscular esse é o primeiro estudo que mostra adaptação da musculatura diafragmática. Estudos adicionais que realizem um acompanhamento das modificações do estresse oxidativo em diferentes músculos são necessários. Todos esses estudos reforçam a teoria de que as modificações do estresse oxidativo ocorrem como eventos precoce

durante a HP, podendo contribuir para as alterações na fase mais avançada da doença.

Na HP já está demonstrada o aumento do estresse oxidativo e a sua importância no desenvolvimento da doença (Grobe *et al.* 2006, Seta *et al.* 2012, Wong *et al.* 2013).Entretanto, para nosso conhecimento a maioria dos estudos abordaram essas alterações no coração (ventrículo direito), aorta e vasos sanguíneos entre outros tecidos e não em músculos periféricos(Jankov *et al.* 2008; Csiszar *et al.* 2009;Dubois *et al.* 2013, Steven *et al.* 2017). Estudos em seres humanos relatam o aumento do MDA no plasma, urina e pulmões de pacientes com HP idiopática (Cracowski *et al.*, 2001; Irodova *et al.* 2002; Bowers *et al.* 2004; Preston *et al.* 2005, Wong *et al.* 2013). O aumento do estresse oxidativo na HP foi demonstrado ocasionando oxidação do DNA, oxidação protéica e aumento do consumo antioxidante desencadeando piora endotelial e de função cardíaca (Cracowski *et al.*, 2001; Irodova *et al.* 2002; Bowers *et al.* 2004; Preston *et al.* 2005, Wong *et al.* 2011). Entretanto, para o nosso conhecimento a análise de marcadores como o MDA e da capacidade antioxidante hidrofílica no músculo esquelético tem sido pouco explorados na HP e a avaliação dos mecanismos envolvidos nessa musculatura são essenciais, pois alterações nesses músculos se relacionam com as limitações funcionais e incapacidades nesses pacientes (Meyer *et al.* 2005; Kabits *et al.* 2008; Himori *et al.* 2017).

A HP tem sido associada com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) que cursam com hipoxemia e fibrose ocasionando disfunção e IC (Wong *et al.* 2013). Sintomas como o cansaço e a fadiga estão relacionados com a elevação das espécies reativas de oxigênio (Supinski *et al.* 1997).No

músculo esquelético (gastrocnemio e vasto lateral) de ratos após a indução de enfisema com elastase houve aumento de marcadores do estresse oxidativo, como o MDA (Mattson *et al.* 2002; Fermoselle *et al.* 2011). No nosso estudo não identificamos essas alterações nos músculos sóleo e EDL o que pode estar relacionada a fase inicial da HP e não uma adaptação crônica (5-6 meses) como ocorreu no estudo de Mattson *et al.* (2002a). Assim, o tempo da doença pode influenciar diretamente na produção dessas espécies reativas de oxigênio. Como nosso estudo é um modelo agudo de sobrecarga cardíaca e essas alterações ainda não começaram a influenciar negativamente os músculos periféricos envolvidos.

Nosso estudo também avaliou o músculo diafragma. Avaliar essa musculatura é fundamental, pois além de ser o principal músculo respiratório suas disfunções como o déficit contrátil estão relacionadas com a dispnéia que é em parte causadora da intolerância aos esforços e limitações funcionais durante a HP (Meyer *et al.* 2005; Supinski & Callahan 2005; Kabits *et al.* 2008; Van Hees *et al.* 2010; Mandres *et al.* 2012; Ahn *et al.* 2013). No estudo de Himori *et al.* (2017) em modelo de HP induzida por monocrotalina ficou demonstrado o papel do estresse oxidativo na disfunção do músculo diafragma com aumento da expressão proteica de marcadores do estresse oxidativo e das enzimas de proteção antioxidantes: oxidase NADPH 2/gp91phox, SOD2, catalase; conteúdo de 3-nitrotyrosine, agregação de actina e oxidação de glutatona. No nosso estudo, no estágio pré clínico da HP houve apenas o aumento da atividade protetora (aumento da capacidade antioxidante total), sem aumentar o MDA e esse fato pode ser um mecanismo regulatório inicial na HP. O sistema antioxidante ativado pode ter impedido a formação dos

radicais livres ou espécies não-radicais (sistema de prevenção). Na HP há hiperventilação, aumento da frequência respiratória e da atividade contrátil nesse músculo que pode ter ocasionado um aumento da ativação da respiração mitocondrial e por isso uma adaptação precoce dessa musculatura (Meyer *et al.* 2005; de Man *et al.* 2011; Manders *et al.* 2012).

Estratégias terapêuticas tanto medicamentosas como também exercícios físicos específicos que proporcionem precocemente a manutenção da elevação antioxidante e proteção no músculo diafragma se faz necessária uma vez que se pode amenizar a evolução da doença.

Uma das limitações do estudo foi não avaliar outros marcadores antioxidantes como outros marcadores de estresse oxidativo como, por exemplo, carbonilação de proteínas, 4 hidroxineonanal, glioxal e metil glioxal.

Conclusão

No estágio pré clínico da hipertensão pulmonar caracterizada por disfunção cardíaca há um estímulo da capacidade antioxidante do músculo diafragma o que pode estar relacionado a sua estrutura muscular e fisiologia metabólica. Outros marcadores de alterações musculares periféricas necessitam ser estudados para melhor compreensão dos mecanismos e propostas de tratamento precoce.

Referências

Ahn B., Empinado H.M., Al-Rajhi M., Judge A.R & Ferreira L.F. (2013) Diaphragm atrophy and contractile dysfunction in a murine model of pulmonary hypertension. *PLoS One*. **8**, e62702. doi: 10.1371/journal.pone.0062702

Barst R.J., McGoon M., Torbicki A. *et al.* (2004) Diagnosis and differential assessment of pulmonar arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **43**, 40-47. doi: 10.1016/j.jacc.2004.02.032

Bechara L.R., Moreira J.B., Jannig P.R. *et al.* (2014). NADPH oxidase hyperactivity induces plantaris atrophy in heart failure rats.*Int. J. Cardiol.* 175, 499-507. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.06.046.

Bertaglia R.S., Reissler J., Lopes F.S. *et al.* (2011) Differential morphofunctional characteristics and gene expression in fast and slow muscle of rats with monocrotaline-induced heart failure. *J. Mol. Hist.***42**, 205–215. doi: 10.1007/s10735-011-9325-7

Beretta G., Aldini G., Facino R.M. *et al.* (2006) Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. Analytical biochemistry. [*In Vitro Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Validation Studies*].**354**, 290-298. doi: 10.1016/j.ab.2006.04.001

Breda A.P., Albuquerque A.L.P., Jardim C. *et al.* (2014) Skeletal muscle abnormalities in pulmonary arterial hypertension. *Plos One.* **9**, e114101. doi: 10.1371/journal.pone.0114101

Bowers R., Cool C., Murphy R.C. *et al.* (2004) Oxidative stress in severe pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**, 764-769. doi: 10.1164/rccm.200301-147OC

Carvalho R.F., Castan E.P., Coelho C.A. *et al.* (2010) Heart failure increases atrogin-1 and MuRF1 gene expression in skeletal muscle with fiber type-specific atrophy. *J. Mol. Histol.* **41**, 81-7. Doi: 10.1007/s10735-010-9262-x

Colombo R., Siqueira R., Becker C.U. *et al.* (2013) Effects of exercise on monocrotaline-induced changes in right heart function and pulmonary artery remodeling in rats. *Physiologie et Pharmacologie* **91**, 38-44. doi: 10.1139/cjpp-2012-0261

Cracowski J.L., Cracowski C., Bessard G. *et al.* (2001) Increased lipid peroxidation in patients with pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 1038–1042. doi: 10.1164/ajrccm.164.6.2104033

Csiszar A., Labinsky N., Olson S. *et al.* (2009) Resveratrol prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Hypertension.* **54**, 668–675. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.133397

Cunha T.F., Bacurau A.V., Moreira J.B. *et al.* (2012) Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure. *PLoS One.* **7**, e41701. doi: 10.1371/journal.pone.0041701.

de Jesus Perez V.A. (2016) Molecular pathogenesis and current pathology of pulmonary hypertension. *Heart Fail. Rev.* **21**, 239–257. doi: 10.1007/s10741-015-9519-2.

de Man F.S., van Hees H.W., Handoko M.L. *et al.* (2011) Diaphragm muscle fiber weakness in pulmonar hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **183**, 1411–1418. doi: 10.1164/rccm.201003-0354OC.

Doggrell A.S. & Brown L. (1996) Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc. Res.* **39**: 89–105. doi:10.1016/S0008-6363(98)00076-5

Dubois M. E., Delannoy L., Dulucetal.(2013) “Biopterin metabolismo and eNO Sex pression during hypoxic pulmonary hypertension in mice,” *PLoS ONE* **8**, e82594. doi.org/10.1371/journal.pone.0082594.

Eguchi M., Ikeda S., KusumotoS.,*et al.* (2014) Adipose-derived regenerative cell therapy inhibits the progression of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Life Sci.* **118**, 306-312.

Farahamand F., Hill M.F. & Singal P.K. (2004) Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. *Mol. Cell. Biochem.* **260**, 21-29.

Fermoselle C., Sanchez F. & Barreiro E. (2011) Reduction of muscle mass mediated by myostatin in an experimental model of pulmonary emphysema. *Archivos de Bronconeumología (English Edition)* **47**, 590-598. doi: 10.1016/j.arbres.2011.07.008

Galie N, Hoeper MM, Humbert M. *et al.* (2009) Committee for Practice Guidelines (CPG). Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur. Heart J.* **30**, 2493–2537. doi: 10.1093/eurheartj/ehp297

Grobe S.M., Wells E., Benavidez P. *et al.* (2006) Increased oxidative stress in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension: role of NADPH oxidase and endothelial NO synthase. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **290**, L1069-1077. doi: 10.1152/ajplung.00408.2005

Guide for the care and use of Laboratory Animals (2001) 8th edn. Washington, DC: National Academies Press.

Guignabert, C. (2015) New Molecular Targets of Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* **147**, 529 – 537. doi: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.14-0862>

Handoko M.L., de Man F.S., Happ_E.C.M. *et al.* (2009) Opposite effects of training in rats with table and progressive pulmonary hypertension. *Circulation* **120**, 42–49. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.829713

Hessel M.H., Steendijk P., den Adel B., Schutte C.I., van der Laarse A. (2006) Characterization of right ventricular function after monocrotaline induced pulmonary hypertension in the intact rat. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291**, 2424–2430. DOI: 10.1152/ajpheart.00369.2006

Henkens I.R., Mouchaers K.T., Vliegen H.W. *et al.* (2007) Early changes in rat hearts with developing pulmonary arterial hypertension can be detected with three-dimensional electrocardiography. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H1300-1307. doi: 10.1152/ajpheart.01359.2006

Himori K., Abe M., Tatebayashi D. *et al.* (2017) Superoxide dismutase/catalase mimetic EUK-134 prevents diaphragm muscle weakness in monocrotalin-induced pulmonary hypertension. *PLoS One*.**12**, e0169146. doi: 10.1371/journal.pone.0169146

Hoepfer M.M., Bogaard HJ., Condliffe R. *et al.* (2013) Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, D42-50. doi: 10.1016/j.jacc.2013.10.032.

Irodova N.L., Lankin V.Z., Konovalova G.K., Kochetov A.G. &Chazova I.E. (2002) Oxidative stress in patients with primary pulmonary hypertension. *Bull. Exp. Biol. Med.***133**, 580–582. doi: 10.1023/A:1020238026534

Jankov R.P., Kantores C., Pan J. &Belik J. (2008) Contribution of xanthine oxidase-derived superoxide to chronic hypoxic pulmonary hypertension in neonatal rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **294**, L233-45. doi: 10.1152/ajplung.00166.2007

Jackson M.J. (2009) Redox regulation of adaptive responses in skeletal muscle to contractile activity. *Free Radic. Biol. Med.***47**, 1267–1275. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.09.005

Kabitz H.J., Schwoerer A., Bremer H.C. *et al.* (2008) Impairment of respiratory muscle function in pulmonary hypertension. *Clin. Sci. (Lond)*.**114**, 165-171. doi: 10.1042/CS20070238

Lopes F.S., Robson F.C., Campos G.E.R. *et al.* (2008) Down-regulation of MyoD gene expression in rat diaphragm muscle with heart failure. *Int. J. Exp. Path.* **89**, 216–222. doi: 10.1111/j.1365-2613.2008.00587.x

Lorgeril M., Salen P., Accominotti M.I. *et al.* (2001) Dietary and blood antioxidants in patients with chronic heart failure. Insights into the potential importance of selenium in heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 2001; **3**, 661-69. doi:10.1016/S1388-9842(01)00179-9

Mattson J.P., Sun J., Murray D.M. & Poole D.C. (2002a) Lipid peroxidation in the skeletal muscle of hamsters with emphysema. *Pathophysiology***8**, 215–221. doi: 10.1016/S0928-4680(02)00011-1

Mattson J.P., Miller T.A., Poole D.C., Delp M.D. (2002b) Fiber composition and oxidative capacity of hamster skeletal muscle. *J HistochemCytochem***50**, 1685-92. Doi: 10.1177/002215540205001214.

Manders E., de Man F.S., Handoko M.L. *et al.* (2012) Diaphragm weakness in pulmonary arterial hypertension: role of sarcomeric dysfunction. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.***303**, L1070–8. doi: 10.1152/ajplung.00135.2012.

Martinez P.F., Bonomo C., Guizoni D.M. *et al.*(2015) Influence of N-acetylcysteine on oxidative stress in slow-twitch soleus muscle of heart failure rats. *Cell. Physiol. Biochem.* **35**, 148-159. doi: 10.1159/000369683

Meyer F.J., Lossnitzer D., Kristen A.V. *et al.* (2005) Respiratory muscle dysfunction in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* 2005; **25**, 125-130. doi: 10.1183/09031936.04.00095804.

Morris N.R., Kermeen F.D. & Holland A.E. (2017) Exercise-based rehabilitation programmes for pulmonary hypertension. *Cochrane Database Syst Rev.* **19**; CD011285. doi: 10.1002/14651858

Nielsen F., Mikkelsen B.B., Nielsen J.B., Andersen H.R. & Grandjean P. (1997) Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin. Chem.* **43**, 1209–1214.

Okada M., Kikuzuki R., Harada T. *et al.* (2008) Captopril attenuates matrix metalloproteinase-2 and -9 in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in rats. *J. Pharmacol. Sci.* **108**, 487-94. doi:10.1254/jphs.08174FP

Pacagnelli F.L., Okoshi K., Campos D.H.S. *et al.* (2014) Physical training attenuates cardiac remodeling in rats with supra-aortic stenosis. *Exp. Clin. Cardiol.* **20**, 3889-3906.

Pacagnelli F.L., Aguiar A.F., Campos D.H.S., *et al.* (2016). Training improves the oxidative phenotype of muscle during the transition from cardiac hypertrophy to heart failure without altering MyoD and myogenin. *Exp. Physiol.* **101**, 1075–1085.

Panagiotou M., Peacock A.J, Johnson M.K. *et al.* (2015) Respiratory and limb muscle dysfunction in pulmonary arterial hypertension: a role for exercise training? *Pulm. Circ.* **5**, 424-434. doi: 10.1086/682431

Polidori C., Pratico D., Savino K. *et al.* (2004) Increased F2 isoprostane plasma levels in patients with congestive heart failure are correlated with antioxidant status and disease severity. *J. Card.Fail* **10**, 334-338. doi: 10.1016/j.cardfail.2003.11.004

Powers S.K., Duarte J., Kavasis A.N. & Talbert E.E. (2010) Reactive oxygen species are signaling molecules for skeletal muscle adaptation. *Exp. Physiol.* **95**, 1–9. doi: 10.1113/expphysiol.2009.050526.

Preston I.R., Tang G., Tilan J.U., Hill N.S. & Suzuki Y.J. (2005) Retinoids and pulmonary hypertension. *Circulation.* **111**, 782–790. doi: 10.1161/01.CIR.0000155254.86840.47.t

Ruiter G., de Man F.S., Scholij I. *et al.* (2013) Reversibility of the monocrotaline pulmonary hypertension rat model. *Eur. Respir. J.* **42**, 553–556. DOI: 10.1183/09031936.00012313.

Roos-Hesselink W. & Zijlstra F. (2011) Pulmonary hypertension, how to diagnose and who to treat? *Netherlands Heart J.* **19**, 493–494. doi: 10.1007/s12471-011-0221-2

Seta F., Rahmani M., Turner P.V. & Funk C.D. (2012) Pulmonary oxidative stress is increased in cyclooxygenase-2 knockdown mice with mild pulmonary hypertension induced by monocrotaline. *PLoS One* **6**, e23439. doi: 10.1371/journal.pone.0023439.

Singal P.K., Khaper N., Farahmand F. & Belló-Klein A. (2000) Oxidative stress in congestive heart failure. *Curr. Cardiol. Rep.* **2**, 206–211. doi: 10.1007/s11886-000-0070-x

Souza-Rabbo M.P., Silva L.F., Auzani J.A. *et al.* (2008) Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **35**, 944–948. doi: 10.1111/j.1440-1681.2008.04936.x.

Supinski G., Nethery D., Stofan D. & DiMarco A. (1997) Effect of free radical scavengers on diaphragmatic fatigue. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **155**, 622–629. doi: 10.1164/ajrccm.155.2.9032204

Supinski G.S. & Callahan L.A. (2005) Diaphragmatic free radical generation increases in an animal model of heart failure. *J. Appl. Physiol.* (2005) **99**, 1078–1084. doi: 10.1152/jappphysiol.01145.2004

Steve S., Oelze M., Brandt M. *et al.* (2017) PentaerythritolTetranitrate In Vivo Treatment Improves Oxidative Stress and Vascular DysfunctionbySuppressionof Endothelin-1 Signaling in Monocrotaline-InducedPulmonaryHypertension. *Oxidative M.andCellular L.* **13**, 2017.doi.org/10.1155/2017/4353462

Tonon J., Guarnier F.A., Brunnuell C.R., Bernardes S.S., Cecchini A.L. (2013a). Oxidative status and chymotrypsin-like activity in right and left ventricle hypertrophy in an experimental model of emphysema. *Pathophysiology***20**, 249–56. doi: 10.1016/j.pathophys.2013.08.003

.Tonon J., Cecchini A.L., Brunnuell C.R., Bernardes S.S., Cecchini R. &Guarnier F.A. (2013b) Lung injury-dependent oxidative status and chymotrypsin-like activity of skeletal muscles in hamsters with experimental emphysema. *BMC Musculoskelet. Disord.* **14**, 39. doi: 10.1186/1471-2474-14-39.

Van Hees H.W., Ottenheijm C.A., Granzier H.L., Dekhuijzen P.N. &Heunks L.M. (2010) Heart failure decreases passive tension generation of rat diaphragm fibers. *Int. J. Cardiol.* **141**, 275–283. doi: 10.1016/j.ijcard.2008.12.042

Voelkel N.F., Cool C., Lee S.D., Wright L. & Geraci M.W. (1998) Primary pulmonary hypertension between inflammation and cancer. *Chest* 114(Suppl 3):225-230. doi: 10.1378/chest.114.3_Supplement.225S

Voelkel N.F., Gomez-Arroyo J., Abbate A., Bogaard H.J. & Nicolls M.R. (2012) Pathobiology of pulmonary arterial hypertension and right ventricular failure. *Eur. Respir. J.* **40**, 6 1555-1565. doi: 10.1183/09031936.00046612

Weant K.A. & Smith K.M. (2005) The role of coenzyme Q10 in heart failure. *Ann Pharmacother.* **39**, 1522-526. doi: 10.1345/aph.1E554

Wong C.M., Bansal G., Pavlickova L., Marcocci L. & Suzuki Y.J. (2013) Reactive oxygen species and antioxidants in pulmonary hypertension. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 1789-96. doi: 10.1089/ars.2012.4568.

ANEXO 1 - APROVAÇÃO ÉTICA

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

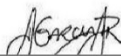
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

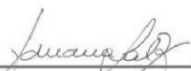
PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO DOS MÚSCULOS PERIFÉRICOS DE RATOS COM HIPERTENSÃO PULMONAR SUBMETIDOS AO TREINAMENTO PREVENTIVO", cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) sob o número nº 2883 e tendo como participante(s) FRANCIS LOPES PACAGNELLI (responsável), ANDRE CASANOVA DE OLIVEIRA (discente), DYOVANA GOMES PINHEIRO (discente), THAOAN BRUNO MARIANO (discente), ANTÔNIO CARLOS CICOGNA (externo), CAMILA CORREA (externo), KATASHI OKOSHI (externo), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Presidente Prudente, 11 de Dezembro de 2015.



Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CCPq

Prof. Ms. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

ANEXO 2 – NORMAS DA REVISTA
INTERNATIONAL JOURNAL EXPERIMENTAL PATHOLOGY

Author Guidelines

International Journal of Experimental Pathology is published as an online-only journal from 2014

Ethics

The *International Journal of Experimental Pathology* (IJEP) encourages its contributors and reviewers to adopt the standards of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). More information on various issues relating to Publication Ethics are dealt with in the relevant sections below and are outlined in full in the separate document Ethical Policies of the International Journal of Experimental Pathology. Submitted work must comply with these policies, which are based on the Best Practice Guidelines on Publication Ethics: a Publisher's Perspective (Graf C, Wager, E, Bowman A et al. *Int J Clin Pract* 2007;61[s152]:1-26) and the Committee on Publication Ethics (COPE) guidelines on good publication and comply with their Code of Conduct. IJEP is a member of the Committee on Publication Ethics. Submission is considered on the conditions that papers are previously unpublished, and are not offered simultaneously elsewhere; that all authors (defined below) have read and approved the content, and all authors have also declared all competing interests; and that the work complies with Ethical Policies of the Journal, and has been conducted under internationally accepted ethical standards after relevant ethical review.

Animal and Human Studies

Manuscripts describing studies involving animals should comply with local/national guidelines governing the use of experimental animals and must contain a statement indicating that the procedures have been approved by the appropriate regulatory body. Manuscripts concerned with human studies must contain statements indicating that informed, written consent has been obtained, that studies have been performed according to the Declaration of Helsinki, and that the procedures have been approved by a local ethics committee. If individuals might be identified from a publication (e.g. from images) authors must obtain explicit consent from the individual.

Disclosures

Authors are required to disclose financial interests (e.g. employment, significant share ownership, patent rights, consultancy, research funding, etc.) in any company or institution that might benefit from their publication. All authors must provide details of any other potential competing interests of a personal nature that readers or editors might consider relevant to their publication. Upon acceptance for publication, all authors should supply this information, to the Journal's Editorial Assistant, Biljana Nikolic at b.nikolic@ucl.ac.uk. All **sources of funding must be disclosed** in the Acknowledgments section of the paper. List governmental, industrial, charitable, philanthropic and/or personal sources of funding used for the studies described in the manuscript and attribute the funding to appropriate authors.

Examples:

- This work was supported by a grant from the National Institutes of Health, USA (DKxxxx to AB).

- This work was supported by the Crohn's and Colitis Foundation of Canada (grant to AB and CD).
- This work was supported by a grant from Big Pharma Inc. (to AB) and equipment was donated by Small Pharma Inc. EF received a graduate studentship award from the University of xxxxx.

Authorship

All authors must fulfil the following three criteria:

- Substantial contributions to research design, or the acquisition, analysis or interpretation of data,
- Drafting the paper or revising it critically, and
- Approval of the submitted and final versions

Submission

All submitted articles are subject to review by experienced referees. The Editors then select and accept manuscripts suitable for publication - the Editors' decisions are final. Manuscripts accepted for publication are copyedited and typeset. The proofs are finally sent to contributors for a final check, but extensive changes to the proofs may be charged to the contributors.

Online submission

Manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/ijep>

To submit you will require a user ID and password, which can be obtained on first use of the submission web site. Full instructions are provided when you enter the website. All file types are supported, but to help Editors and reviewers view the submission the following types are recommended:

Text: Microsoft Word or generic rich text format (RTF).

Figures: TIFF is preferred. JPEG, GIF, EPS, PNG Microsoft PowerPoint, Microsoft Excel are also acceptable.

**Update (25 May 2012): Please note that we now accept .doc and .docx files.*

It is strongly recommended that, where possible, you combine all parts of your submission into a single document. Alternatively you may submit the text of the manuscript (including front page, summary, body of text, references and legends to tables and figures) as one document, with tables and figures as a separate file.

Full help and support for on-line submissions are provided by e-mail

(support@scholarone.com), or via the website (<http://blackwellsupport.custhelp.com>) or telephone (+ 1 434-817-2040 ext. 167).

Hardcopy submission

If online submission is not possible, authors should send original papers to the editor at the address below.

The Editor, Professor D.R. Katz International Journal of Experimental Pathology
Division of Infection and Immunity University College London Cruciform Building
Gower Street London WC1E 6BT, UK

Email: b.nikolic@ucl.ac.uk

Tel: 020 3108 2122 Fax: 020 3108 2123

Conditions of acceptance

Papers are accepted on the understanding that no substantial part has been, or will be, published elsewhere. All submitted articles will be scrutinised for possible overlap and duplication with already published work. Papers may be subject to editorial revision without notice and remain the copyright of the journal. If a paper that has been returned to authors for revision is not received back in the editorial office after 90 days, it will be treated as a new submission. The Editors reserve the right to make the final decision whether or not a paper is accepted.

The author who submits a paper for publication is responsible that all other authors agree to its submission. All manuscripts must be accompanied by a covering letter signed by all authors. Persons named in the acknowledgements, and those responsible for any personal communications, must have agreed formally to their names so appearing.

Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and

Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing Online Open

If the Online Open option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>. See the Online Open section below for more information.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Online Open

Online Open is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive.

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright-->

License.html. All Online Open articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Manuscripts

Manuscripts must be saved for submission in double spaced format. If submitted as hardcopy they should be printed on one side of the paper only.

The date of submission used will be the date of submission of the electronic text version, or on receipt of the hard copy text plus illustrations, as applicable. Authors are advised to keep a copy of all manuscripts, as no responsibility can be accepted for loss.

The text should follow the following format:

Front page:

A single 'front page' must give: (1) the title of the manuscript; (2) a short running title (not exceeding 40 characters); (3) the name(s) of the author(s) including forename and surname; (4) the department(s) in which the work was done; and (5) the name, full postal address, fax number and e-mail address of the author to whom the proofs and requests for offprints should be sent, to be headed 'Correspondence'. The Corresponding Author should take responsibility for communicating with all other authors and getting their approval for the final version to be published. During online submission corresponding authors can nominate an individual, who may or may not be an author, to assist them with administration of the publication process.

You should confirm that all listed authors meet ICMJE authorship criteria and that nobody who qualifies for authorship has been excluded. Credit for authorship should be based on: [1] substantial contributions to research design, or the acquisition, analysis or interpretation of data; [2] drafting the paper or revising it critically; [3] approval of the submitted and final versions. Authors should meet all three criteria.

Second page:

The second page should contain a summary paragraph which should give a factual account of the context in which the study has been performed, the objective(s), methods and results, and a brief conclusion, in not more than 250 words. For refereeing and indexing purposes, up to six 'keywords' related to subjects discussed in the paper should be identified and included at the foot of the summary.

Text

Reports of original work should usually be arranged in the conventional order of introduction, methods, results, discussion, acknowledgements and references, with suitable headings for each part. Further sub-divisions, with appropriately less significant headings, can be used. Results may be presented in the text, in tables and figures, but the text should, in general, comment on rather than repeat information in tables.

General

Papers must be written in clear, concise English. Spelling should follow The Concise Oxford Dictionary of Current English. Avoid jargon and neologisms. The journal is unable to undertake major corrections of language, which is the

responsibility of the author. Where English is not the first language of the authors, the paper should be checked by a native English speaker. Authors may suggest the names of suitable referees in a covering letter, or via the website, if they so wish.

Reviews

Reviews will normally be commissioned. Authors wishing to submit unsolicited reviews are advised to consult the editor in advance, as they will not be considered unless this has been done. Once the editor has agreed to consider a review, the guidelines for submitting on line are the same as for original article.

Letters to the Editor Correspondence which relates to papers which have recently appeared in the Journal may be published. The Editor reserves the right to invite a response from the original authors for publication alongside. Letters should be as short as possible (but no more than 1000 words of text, two figures or tables or one of each, and up to 10 references). Correspondence to the journal is accepted on the understanding that the contributing author licences the publisher to publish the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the journal and its contents.

Tables and Figures

For online submission, illustrations should be embedded in the Word document or uploaded as separate files. Quality should be sufficient for viewing on-screen and desktop printing.

Where possible, please provide high quality digital artwork files.

Both tables and figures should be numbered consecutively with Arabic numerals. Each should have a separate descriptive legend. Keys should be given in the legends, not in the figure itself. All illustrations, both drawings and photographs, must be of good quality since delay will result if referees need to see improved versions. Digital versions of figures should be supplied in TIFF format. As a guide, the ideal figure resolution/specification for various types of original figures, at their final size, is as follows:

Line art and diagrams - Minimum 600 dpi
Halftone (both B/W and Colour photographs) - Minimum 300 dpi
Line and tone (line art and halftone combined) - Minimum 600 dpi

It is best to use Illustrator or Photoshop software and to save the material in the format '.eps' or '.tif'. If you are unable to provide these formats, please save the figures in as many different file formats as possible. In addition to any electronic files, always send three high-quality printed versions of the figures to the editorial office. For further information on file formats, please see the instructions on our website at <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp>

Colour Illustrations

As the journal is published online-only, colour figures are published online for free.

Measurements

Measurements should be expressed in SI units. If the original observations were recorded in other units, this should be stated, together with the appropriate conversion factors.

Standard Abbreviations

Standard abbreviations should be used and should follow those laid down in *Units, Symbols and Abbreviations* (1994) published by the Royal Society of Medicine. Abbreviations should be used sparingly and only if a lengthy name or expression is repeated frequently throughout the manuscript. Words must appear in full on first appearance in both summary and text, followed by the abbreviation in parentheses. Drugs should be described by their official names but trade names should be indicated in parentheses the first time the drug is quoted in the text.

References

We recommend the use of a tool such as Reference Mmanager for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here:<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>.

References must be double spaced and should be made only to papers closely related to the author's work. Exhaustive lists should be avoided. In the text, use the name of the author(s) followed by the date of publication; where there are two authors use the form: Sorensen and Read 2002; where there are more than two authors use the form: Turton et al. 2002.

Arrange the list of authors quoted at the end of the text in alphabetical order set out as follows:

A) Name(s) and initials of author(s), year of publication (in parentheses), title of the article, name of the journal, volume number, first and last page numbers. Abbreviate journal names according to the Index Medicus system. (Also see International Committee of Medical Journal Editors: Uniform requirements for

manuscripts submitted to biomedical journals. N Engl J Med 1997;336: 309-315.)

B) In the case of books the order is: name(s) and initials of author(s), year of publication (in parentheses), chapter title, full book title, edition, names of the editors, place and name of publisher, and page numbers.

C) References to 'personal communications' and 'unpublished work' may be quoted in the text with all names and initials to avoid confusion but should not be included in the references.

Examples of the style to be used are given below:

Turton J.A., Andrews C.M., Havard A.C. & Williams T.C. (2002) Studies on the haemotoxicity of chloramphenicol succinate in the Dunkin Hartley guinea pig. *Int. J. Exp. Path.* 83, 225-238.

Katz D.R., & Pollara G. (2003) Surviving the immune response: an immunologist's perspective. In *Dormancy and Low Growth States in Microbial Diseases*. Ed A. Coates. Cambridge University Press pp 75-100.

Permissions

Materials copied from other sources must be accompanied by a written statement from both author and publisher giving permission to the *International Journal of Experimental Pathology* for reproduction. Authors are responsible for obtaining permission in writing from at least one author of papers cited while still in press, as well as of unpublished data and of personal communications. It is the author's responsibility to ensure that permissions are obtained.

Author Material Archive Policy

Unless specifically requested, Wiley-Blackwell will dispose of all hard copy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Production Editor as soon as possible if you have not yet done so.

Page Proofs

Proofs will be sent electronically via e-mail as an Acrobat PDF file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web

site:www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html

This will enable the file to be opened, read and corrected on screen. Further instructions will be sent at the same time as the proof. Proofs will be posted if no e-mail address is available. In your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

EarlyView

The *International Journal of Experimental Pathology* is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no

changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Citing online articles

The Journal encourages citation of online articles before they are published in final form when they become available in PubMed or from journal/publisher websites, e.g. Early View articles from the *International Journal of Andrology* website. The citation must take the following form:

Author(s), Title, Journal, Year; in press (DOI).

Any article that lacks a year of publication or a DOI will not be considered a valid reference citation and cannot be cited.

Online production tracking is now available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services.

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production so they don't need to contact the production editor to check on progress. Visit authorservices.wiley.com/bauthor for more details on online production

tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Note to NIH Grantees Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 6 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

ANEXO 3
COMPROVANTE DE SUBMISSÃO À REVISTA

Seguro | <https://mc.manuscriptcentral.com/ijep>

ScholarOne Manuscripts™ Francis Pacagnelli ▾ Instructions & Forms Help Log Out

INTERNATIONAL JOURNAL OF **Experimental Pathology**

Home Author Review

Author Dashboard / [Submission Confirmation](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to	International Journal of Experimental Pathology
Manuscript ID	IJEP-2017-06-2591
Title	PRE-CLINICAL STAGE OF PULMONARY HYPERTENSION MODIFIES DIAPHRAGM ANTIOXIDANT CAPACITY WITHOUT ALTERING PERIPHERAL SKELETAL MUSCLE
Authors	de Oliveira, Andre Sabela, Ana Karénina Mariano, Thaoan Soares, Dijon Guarnier, Flávia Okoshi, Katashi Corrêa, Camilla Pacagnelli, Francis
Date Submitted	29-Jun-2017