

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**Dissertação de Mestrado**

EFEITOS DO BETA-BLOQUEADOR BUCINDOLOL NA MODULAÇÃO DO  
REMODELAMENTO DO VENTRÍCULO DIREITO EM MODELO DE  
HIPERTENSÃO PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA

**Bruna Gazzi de Lima Seolin**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriane Belló-Klein

Porto Alegre, outubro de 2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**Dissertação de Mestrado**

EFEITOS DO BETA-BLOQUEADOR BUCINDOLOL NA MODULAÇÃO DO  
REMODELAMENTO DO VENTRÍCULO DIREITO EM MODELO DE  
HIPERTENSÃO PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA

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

**Bruna Gazzi de Lima Seolin**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriane Belló-Klein

Porto Alegre, outubro de 2015

*“ É nos momentos de decisão que o seu destino é traçado. ”*

**Anthony Robbins**

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a **Deus**, por ter me dado a chance de ser aquilo que escolhi, e por ter confiado a mim o dom de ensinar.*

*Aos meus pais, **Reno e Ivete**, por terem acreditado em mim e por todo o apoio. Vocês são um grande exemplo de família, de vida, força, coragem, perseverança e energia infinita.*

*À minha mana **Sabrina** por estar sempre presente em minha vida, torcendo pelo meu sucesso.*

*Ao meu afilhado e sobrinho **Rafael**, por ser uma das minhas maiores motivações para ser uma pessoa sempre melhor. E ao meu sobrinho **Vicente**, pela alegria que me traz.*

*Ao Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFRGS, pelo acolhimento, por estarem sempre dispostos a ajudar e a compartilhar o conhecimento, pelas amizades e brincadeiras. Gostaria de agradecer aos colegas **Rayane, Jéssica e Rafael Colombo**. Sem vocês não teria sido possível. **Luiza**, obrigada por levar os meus resultados adiante, sempre com entusiasmo.*

*A professora **Karina Rabello Casali**, da UNIFESP, pelo apoio técnico para a análise espectral.*

*Em especial, meus agradecimentos e admiração à minha orientadora **Adriane Belló-Klein**. Por ter me recebido em seu laboratório, e por todas as palavras de incentivo. Obrigada por acreditar em mim, e me dar todo o suporte para que eu alcançasse voo.*

*Ao meu marido **Vinícius**, nenhuma palavra seria o suficiente para agradecer. Tu és a melhor parte de mim. Te amo!*

*Aos demais amigos e familiares, agradeço pela compreensão nos momentos de ausência.*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1. HIPERTENSAO PULMONAR .....	19
1.2. HIPERTENSAO ARTERIAL PULMONAR.....	22
1.2.1. Epidemiologia .....	22
1.2.2. Definição .....	23
1.2.3. Fisiopatologia .....	24
1.2.4. Estresse Oxidativo .....	29
1.2.5. Modelo Experimental de HAP.....	33
1.3. SISTEMAS ENVOLVIDOS NO REMODELAMENTO VENTRICULAR.....	37
1.3.1. Efeitos da Hiperatividade Simpática.....	37
1.4. BLOQUEADORES $\beta$ -ADRENERGICOS NO REMODELAMENTO CARDIACO .41	
1.4.1. O Uso de Bloqueadores Beta-Adrenérgicos.....	41
1.4.2. Receptores Adrenérgicos no Controle Cardiovascular.....	42
1.4.3. Mecanismo de Ação dos Beta-Bloqueadores.....	44
1.4.4. A Utilização dos Beta-Bloqueadores na Prática Clínica.....	46
1.4.5. Beta-bloqueador Bucindolol .....	48
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>52</b>
<b>3. FORMULAÇÃO DO PROBLEMA</b> .....	<b>54</b>
<b>4. HIPÓTESE</b> .....	<b>54</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>54</b>
5.1. OBJETIVO GERAL .....	54
5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	54
<b>6. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>56</b>
6.1. ANIMAIS.....	56
6.2. CALCULO AMOSTRAL.....	56

6.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	57
6.4. BIOÉTICA COM OS ANIMAIS .....	57
6.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....	58
6.5.1. Ambientação dos Animais .....	58
6.5.2. Administração da Monocrotalina.....	58
6.5.3. Administração do Beta-bloqueador Bucindolol.....	58
6.6 ANÁLISES FUNCIONAIS, HEMODINÂMICAS E ESTRUTURAIS.....	60
6.6.1. Avaliação Ecocardiográfica .....	60
6.6.2. Avaliação Hemodinâmica – Cateterismo Artéria Femoral.....	61
6.6.3. Avaliação Hemodinâmica – Cateterismo Ventriculo Direito.....	64
6.6.4. Avaliação da Hipertrofia Cardíaca.....	66
6.6.5. Avaliação da Congestão Pulmonar e Hepática .....	66
6.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	67
6.7.1. Homogeneização do Ventriculo Direito .....	67
6.7.2. Quantificação de Proteínas .....	67
6.7.3. Avaliação das Enzimas Antioxidantes.....	68
6.7.4. Concentração de Peróxido de Hidrogênio no Ventriculo Direito .....	69
6.7.5. Substâncias Reativas ao Acido Tiobarbitúrico (TBARS).....	70
7. BIOSSEGURANÇA E DESCARTE DE ANIMAIS E RESÍDUOS.....	71
8. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	71
9. RESULTADOS.....	72
9.1 AVALIAÇÃO DA MASSA CORPORAL .....	72
9.2 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA .....	74
9.2.1. Hipertrofia do Ventrículo Direito.....	74
9.2.2. Congestão Pulmonar e Congestão Hepática.....	75

9.3 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA – VENTRÍCULO DIREITO .....	77
9.3.1. Pressões Ventriculares e Derivadas de Pressão.....	77
9.3.2. Pressão da Artéria Pulmonar .....	78
9.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	80
9.5 ANÁLISES ECOCARDIOGRÁFICAS .....	84
9.5.1. Função Sistólica do Ventrículo Direito.....	84
9.5.2. Função Diastólica do Ventrículo Direito.....	89
9.5.3. Resistência Vascular Pulmonar .....	89
9.5.4. Índice de Performance Miocárdica .....	91
9.6 ANÁLISE ESPECTRAL – SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO .....	92
9.6.1. Frequência Cardíaca .....	92
9.6.2. Variabilidade da Frequência Cardíaca.....	93
9.6.3. Sistema Nervoso Simpático no Controle Cardíaco.....	94
9.6.4. Sistema Nervoso Parassimpático no Controle Cardíaco .....	95
9.6.5. Balanço Simpato-Vagal no Controle Cardíaco .....	97
9.6.6. Pressão Arterial .....	98
9.6.7. Variabilidade da Pressão Arterial.....	99
9.6.8. Sistema Nervoso Parassimpático no Controle Vascular.....	100
9.6.9. Sistema Nervoso Simpático no Controle Vascular .....	101
10. DISCUSSÃO .....	103
11. CONCLUSÃO.....	117
12. PERSPECTIVAS .....	
13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	

## RESUMO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é caracterizada pelo aumento da resistência vascular pulmonar (RVP). Em decorrência, há elevação da pós-carga imposta ao ventrículo direito (VD) e hipertrofia. Assim, com aumento de consumo de O<sub>2</sub> pelo miocárdio, é provável que o estresse oxidativo esteja participando do desenvolvimento e progressão desta doença. Sabe-se que o bloqueio beta-adrenérgico diminui a mortalidade de pacientes com insuficiência cardíaca à esquerda, porém pouquíssimas pesquisas referem sua utilização na insuficiência cardíaca à direita. O bucindolol é um beta-bloqueador que atua nos receptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\alpha_1$  e com propriedade simpatomolítica. O objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que o tratamento com bucindolol poderia reduzir a hipertrofia do VD e melhorar a função sistólica e diastólica do miocárdio. Foram utilizados ratos Wistar machos pesando 130±10 gramas divididos em quatro grupos (n=7-10/grupo): monocrotalina sem bucindolol (MCT SEM BCD), monocrotalina bucindolol (MCT+BCD), controle sem bucindolol (CTR SEM BCD) e controle bucindolol (CTR+BCD). A HAP foi induzida por meio de uma dose única de monocrotalina (60 mg/Kg – i.p.). Após duas semanas, os animais foram tratados por sete dias com bucindolol (2 mg/Kg/dia – i.p.) ou veículo. No 22º dia após a administração da monocrotalina, os animais foram anestesiados (i.p.) com quetamina (90 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), submetidos à ecocardiografia, cateterismo da artéria femoral, cateterismo do VD e decapitados, com posterior coleta dos tecidos. Os resultados foram avaliados utilizando ANOVA de duas vias (Sigma Plot 12.0) seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls, com nível de significância  $P<0,05$ . Os animais



monocrotalina apresentaram diminuição (22%) no ganho da massa corporal e o bucindolol não foi eficaz em reduzir a hipertrofia ventricular direita encontrada nesta doença. A congestão pulmonar encontrada nos animais com HAP, foi atenuada (22% inferior) nos que receberam o tratamento com o beta-bloqueador. A HAP ocasionou aumento da lipoperoxidação e bucindolol não melhorou este acontecimento. Os animais MCT+BCD além de apresentarem redução nas pressões sistólica (37%) e diastólica final do ventrículo direito (60%), foram capazes de manter uma contratilidade elevada concomitantemente a uma maior capacidade de relaxamento, visualizada através das derivadas de pressão. O bucindolol esteve associado a benefícios na função ventricular direita (tais como mudança de área fracional, TAPSE, fração de encurtamento, volume sistólico e débito cardíaco). Além disso, minimizou a RVP (25%) e a pressão da artéria pulmonar (30%), tornando menor o esforço do miocárdio para exercer sua função de bomba. A HAP também promoveu alterações no controle autonômico cardíaco e vascular. O tratamento com bucindolol reduziu a atividade simpática e aumentou a atividade parassimpática. Assim, concluímos que bucindolol foi o fator contribuinte para atenuar a disfunção ventricular direita causada pela HAP.

**Palavras-chave:** hipertensão pulmonar, sistema nervoso simpático, insuficiência cardíaca direita, beta-bloqueador, bucindolol.

## ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension is a rapidly progressive disease with poor prognosis, characterized by increase in pulmonary vascular resistance. As a result, there is an elevation of afterload imposed to the right ventricle and hypertrophy. Thus, since there is a rise in myocardial oxygen consumption, it is probable that oxidative stress is contributing to the development and progression of this disease. It is known that beta-adrenergic blockade reduces mortality in patients with left ventricular heart failure, but limited studies relate their use in right ventricular heart failure. The bucindolol is a beta-blocker that acts on receptors  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\alpha_1$  and presents sympatholytic property. The aim of this study was to test the hypothesis that treatment with bucindolol could reduce right ventricular hypertrophy and improve systolic and diastolic function of the myocardium. Male Wistar rats weighing  $130 \pm 10$  grams were divided into four groups ( $n=7-10$ /group): monocrotaline without bucindolol (MCT WITHOUT BCD), monocrotaline bucindolol (MCT+BCD), control without bucindolol (CTR WITHOUT BCD) and control bucindolol (CTR+BCD). Pulmonary arterial hypertension was induced by a single dose of monocrotaline (60 mg/Kg – i.p.). After two weeks, the animals were treated for seven days with bucindolol (2 mg/Kg/day – i.p.) or vehicle. Twenty-two days after administration of monocrotaline, the animals were anesthetized intraperitoneally with ketamine (90 mg/Kg) and xylazine (10 mg/Kg), underwent echocardiography, catheterization of the femoral artery and of the right ventricle, decapitation and subsequent collection of tissues (heart, lungs, liver and tibia). The results were analyzed using two-way ANOVA (Sigma Plot 12.0) followed by

Student-Newman-Keuls test, with  $P < 0.05$  of significance level. The MCT WITHOUT BCD animals showed a decrease (22%) in the gain of body mass and the bucindolol was not effective in reducing right ventricular hypertrophy found in this disease. Pulmonary congestion found in animals with PAH, was attenuated (22%) in those receiving beta-blocker treatment. Pulmonary arterial hypertension increased lipid peroxidation and bucindolol did not improve this outcome. The MCT+BCD animals, besides of presenting a reduction in systolic (37%) and end-diastolic right ventricle pressures (60%), were able to maintain a high contractility together with a greater capacity of relaxation, observed by the derived pressures. The bucindolol was associated with improvements in right ventricular function (such as fractional area change, TAPSE, shortening fraction, stroke volume and cardiac output). In addition, it was able to minimize the pulmonary vascular resistance (25%) and pulmonary artery pressure (30%), reducing myocardium effort to exert its pump function. PAH also promoted changes in cardiac and vascular autonomic control. However, treatment with bucindolol reduced the sympathetic and increased parasympathetic activities. Thus, we conclude that bucindolol was the contributing factor to attenuate right ventricular dysfunction caused by PAH.

**Keywords:** pulmonary hypertension, sympathetic nervous system, right heart failure, beta-blocker, bucindolol.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Artéria pulmonar em uma situação normal e na hipertensão pulmonar.

**Figura 2:** Formato e espessura do ventrículo direito em uma situação normal e na hipertensão arterial pulmonar de acordo com a Lei de *Laplace*.

**Figura 3:** Terapias atualmente recomendadas para hipertensão pulmonar e seus alvos moleculares.

**Figura 4:** Distribuição dos elétrons no orbital externo da molécula de oxigênio e redução da molécula à água, justificando a formação de espécies reativas de oxigênio na cadeia de transporte de elétrons.

**Figura 5:** Ação integrada dos diferentes mecanismos antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos.

**Figura 6:** Foto da vagem, das sementes e das flores das espécies pertencentes ao gênero *Crotalaria*.

**Figura 7:** Estrutura química e metabolismo da monocrotalina.

**Figura 8:** Contração dos cardiomiócitos e sua regulação por receptores adrenérgicos.

**Figura 9:** Estrutura química do bucindolol.

**Figura 10:** Desenho experimental do estudo.

**Figura 11:** Incisão e dissecação do tecido conjuntivo e muscular para expor a artéria femoral, seguida pela separação da artéria e veia femoral.

**Figura 12:** Inserção do cateter através da incisão no vaso, seguida pela sutura do cateter no local.

**Figura 13:** Pressão arterial, obtida através do cateterismo da artéria femoral.

**Figura 14:** Introdução do cateter através da veia jugular, alcançando o ventrículo direito.

**Figura 15:** Pressão ventricular direita, obtida através do cateterismo da veia jugular.

**Figura 16:** Análise temporal da massa corporal de ratos Wistar machos.

**Figura 17:** Ganho de massa corporal, em porcentagem, ao longo do tempo.

**Figura 18:** Análise da pressão na artéria pulmonar (PAP) de ratos Wistar machos.

**Figura 19:** Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em homogeneizado de ventrículo direito de ratos Wistar machos.

**Figura 20:** Concentração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em homogeneizado de ventrículo direito de ratos Wistar machos.

**Figura 21:** Atividade da enzima catalase (CAT) em homogeneizado de ventrículo direito de ratos Wistar machos.

**Figura 22:** Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) em homogeneizado de ventrículo direito de ratos Wistar machos.

**Figura 23:** Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogeneizado de ventrículo direito de ratos Wistar machos.

**Figura 24:** Imagem representativa do diâmetro diastólico e sistólico do ventrículo direito, obtida através da ecocardiografia.

**Figura 25:** Imagem representativa do TAPSE, obtida através da ecocardiografia.

**Figura 26:** Imagem representativa do fluxo pela artéria pulmonar (TAC/TEJ), obtida através da ecocardiografia.

**Figura 27:** Relação do tempo de aceleração / tempo de ejeção (TAC/TEJ) do fluxo de sangue pela artéria pulmonar de ratos Wistar machos.

**Figura 28:** Análise da resistência vascular pulmonar (RVP) de ratos Wistar machos.

**Figura 29:** Análise do Índice de Performance Miocárdica (IPM) de ratos Wistar machos.

**Figura 30:** Análise espectral no domínio da frequência. Frequência cardíaca de rato Wistar machos.

**Figura 31:** Análise espectral no domínio da frequência. Variabilidade da frequência cardíaca rato Wistar machos.

**Figura 32:** Análise espectral no domínio da frequência. Faixa de baixa frequência normalizada (LFnu) de ratos Wistar machos.

**Figura 33:** Análise espectral no domínio da frequência. Faixa de alta frequência normalizada (HFnu) de ratos Wistar machos.

**Figura 34:** Análise espectral no domínio da frequência. Balanço simpato-vagal (LF/HF) de ratos Wistar machos.

**Figura 35:** Pressão arterial diastólica de ratos Wistar machos.

**Figura 36:** Pressão arterial sistólica de rato Wistar machos.

**Figura 37:** Variabilidade da pressão arterial de ratos Wistar machos.

**Figura 38:** Variabilidade da pressão arterial sistólica (SAPV). Faixa de alta frequência (HF) de ratos Wistar machos.

**Figura 39:** Variabilidade da pressão arterial sistólica (SAPV). Faixa de baixa frequência (LF) de ratos Wistar machos.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Classificação atualizada da hipertensão pulmonar, segundo o 5º Simpósio Mundial da Hipertensão Pulmonar em Nice, França, em 2013.

**Tabela 2:** Efeitos da ativação dos diferentes receptores adrenérgicos na insuficiência cardíaca.

**Tabela 3:** Comparação farmacodinâmica dos principais beta-bloqueadores.

**Tabela 4:** Comparação da propriedade antioxidante dos principais beta-bloqueadores.

**Tabela 5:** Parâmetros morfométricos (índices de hipertrofia do ventrículo direito) de ratos Wistar machos.

**Tabela 6:** Parâmetros morfométricos (índices de congestão pulmonar e hepática) de ratos Wistar machos.

**Tabela 7:** Parâmetros hemodinâmicos (cateterismo do ventrículo direito) de ratos Wistar machos.

**Tabela 8:** Parâmetros ecocardiográficos (função sistólica do ventrículo direito) de ratos Wistar machos.

**Tabela 9:** Parâmetros ecocardiográficos (função diastólica do ventrículo direito) de ratos Wistar machos.



## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>AC</b>	adenilato ciclase
<b>AMPc</b>	adenosina 3',5' - monofosfato cíclico
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	ânion superóxido
<b>LF/HF</b>	balanço simpato-vagal
<b>BCD</b>	bucindolol
<b>CAT</b>	catalase
<b>HF</b>	componente de alta frequência (simpático)
<b>LF</b>	componente de baixa frequência (parassimpático)
<b>CTR+BCD</b>	controle bucindolol
<b>CTR SEM BCD</b>	controle sem bucindolol
<b>DC</b>	débito cardíaco
<b>DdVD</b>	diâmetro diastólico do ventrículo direito
<b>DsVD</b>	diâmetro sistólico do ventrículo direito
<b>EROs</b>	espécies reativas de oxigênio
<b>TAPSE</b>	excursão sistólica do plano do anel da tricúspide
<b>PLC</b>	fosfolambam
<b>FEC</b>	fração de encurtamento
<b>FC</b>	frequência cardíaca
<b>GSH</b>	glutaciona oxidada
<b>GPx</b>	glutaciona peroxidase
<b>GSSG</b>	glutaciona reduzida

<b>GDP</b>	guanosina difosfato
<b>GTP</b>	guanosina trifosfato
<b>HAP</b>	hipertensão arterial pulmonar
<b>HVD</b>	hipertrofia ventricular direita
<b>HP</b>	hipertensão pulmonar
<b>dP/dt<sub>máx</sub></b>	índice de contratilidade do ventrículo direito
<b>IPM</b>	índice de performance miocárdica
<b>dP/dt<sub>mín</sub></b>	índice de relaxamento do ventrículo direito
<b>IC</b>	insuficiência cardíaca
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>MCT</b>	monocrotalina
<b>MCT+BCD</b>	monocrotalina bucindolol
<b>MCT SEM BCD</b>	monocrotalina sem bucindolol
<b>MAF</b>	mudança de área fracional
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	oxigênio single
<b>PAP</b>	pressão da artéria pulmonar
<b>PCAP</b>	pressão em cunha da artéria pulmonar
<b>PDFVD</b>	pressão diastólica final do ventrículo direito
<b>PSVD</b>	pressão sistólica do ventrículo direito
<b>RL</b>	radicais livres
<b>OH<sup>•</sup></b>	radical hidroxil
<b>PKA</b>	proteína quinase A
<b>E/A</b>	velocidade de enchimento rápido / lento do ventrículo direito

<b>RVP</b>	resistência vascular pulmonar
<b>SNA</b>	sistema nervoso autônomo
<b>SNP</b>	sistema nervoso parassimpático
<b>SNS</b>	sistema nervoso simpático
<b>SOD</b>	superóxido dismutase
<b>TAC/TEJ</b>	tempo aceleração/tempo ejeção do fluxo pela artéria pulmonar
<b>VFC</b>	variabilidade da frequência cardíaca
<b>VPA</b>	variabilidade da pressão arterial
<b>VD</b>	ventrículo direito
<b>VE</b>	ventrículo esquerdo
<b>VS</b>	volume sistólico

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. HIPERTENSÃO PULMONAR

A hipertensão pulmonar (HP) é uma doença crônica, de variada etiologia, instalação aguda ou insidiosa, inicialmente com sintomas inespecíficos, de rápida evolução e mau prognóstico, constituindo a mais importante alteração patológica desta circulação (HOEPER e GRANTON, 2011). Pode ocorrer como um acontecimento independente ou associado a alterações cardiopulmonares, estando relacionada a altos níveis de morbidade e mortalidade (KIELY *et al.*, 2013).

Caracterizada como uma doença progressiva que advém de alterações vasculares, ocasiona redução gradativa do lúmen, resultando em um aumento da resistência vascular pulmonar (RVP) com elevação inapropriada dos níveis pressóricos. Em seu processo final, por sobrecarga do ventrículo direito (VD) pode haver disfunção e falência deste ventrículo, com conseqüente morte antecipada (AUSTIN *et al.*, 2013).

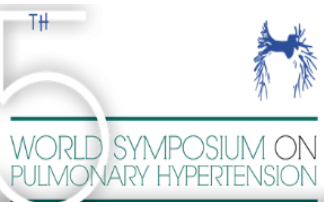
Durante os últimos 20 anos, inúmeros estudos com o objetivo de promover alterações benéficas na HP foram realizados; entretanto, poucos realmente contribuíram de uma forma translacional efetiva com a conduta clínica para o manejo dessa doença (GURTU e MICHELAKIS, 2015). Na última década, o aperfeiçoamento das técnicas de imagem e nos biomarcadores utilizados para triagem dos pacientes com HP vem sendo intensamente observado (ROMANO, 2010). Em virtude dos avanços, surgem avaliações mais detalhadas e aprimorados tratamentos. No entanto, a HP continua sendo uma condição

altamente incapacitante, sem cura e de encurtamento da vida (GURTU e MICHELAKIS, 2015). Isto se deve, a um atraso de cerca de dois anos do início dos sintomas até o diagnóstico (BADESCH *et al.*, 2010). Além disso, devido às complicações desenvolvidas, internações ocorrem com frequência e de forma prolongada (VAILLANCOURT *et al.*, 2014).

A HP define-se, pela constatação de uma pressão arterial pulmonar média (PAP) igual ou acima de 25 mmHg em repouso, em uma situação de pressão em cunha da artéria pulmonar (PCAP)  $\leq$  15 mmHg, com RVP  $>$  3 unidades Wood (MONTANI *et al.*, 2013), sendo todas essas medidas obtidas através de cateterismo cardíaco (BADESCH *et al.*, 2009). O valor normal da PAPm em repouso é  $14 \pm 3.3$  mmHg, tendo como limite superior normal o valor de 20,6 mmHg. Faltam estudos para a definição do significado e evolução de PAPm situadas entre 21 e 24 mmHg (REIS *et al.*, 2010). A definição de HP no exercício físico, como PAPm superior a 30 mmHg, não tem suporte na literatura publicada, já que há indivíduos saudáveis que atingem valores superiores a este durante a prática de atividade física. Portanto, no 4º Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar ocorrido em Dana Point no ano de 2008, por falta de um consenso adequado, sua presença foi retirada da definição hemodinâmica (BADESCH *et al.*, 2009).

O constante surgimento de conhecimentos sobre a fisiopatologia da HP vem conduzindo à necessidade de rever conceitos e classificações existentes (ROMANO, 2010). Desta forma, a classificação mais atual da HP, apresentada em 2013, no 5º Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar, a divide em cinco grupos que compartilham semelhanças em seus mecanismos fisiológicos, nos quadros

clínicos e nas abordagens terapêuticas (SIMONNEAU *et al.*, 2013). Estas novas classificações estão apresentadas na tabela 1.

Prada LFL, Vitória PK, Souza R	Classificação da hipertensão pulmonar
<b>Quadro 1</b> – Classificação da hipertensão pulmonar (Nice, 2013).	
<p><b>1. Hipertensão arterial pulmonar (HAP)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>1.1 HAP idiopática</li> <li>1.2 HAP hereditária               <ul style="list-style-type: none"> <li>1.2.1 BMPR2</li> <li>1.2.2 ALK-1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3</li> </ul> </li> <li>1.3 HAP induzida por drogas e toxinas</li> <li>1.4 HAP associada               <ul style="list-style-type: none"> <li>1.4.1 doenças do tecido conectivo</li> <li>1.4.2 infecção por HIV</li> <li>1.4.3 hipertensão portal</li> <li>1.4.4 doença cardíaca congênita</li> <li>1.4.5 esquistossomose</li> </ul> </li> </ul>	
<b>1<sup>o</sup>. Doença pulmonar veno-oclusiva e hemangiomatose capilar pulmonar</b>	
<b>1<sup>o</sup>. Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido</b>	
<p><b>2. Hipertensão pulmonar causada por doenças do coração esquerdo</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>2.1 disfunção sistólica</li> <li>2.2 disfunção diastólica</li> <li>2.3 doença valvar</li> <li>2.4 outras doenças congênicas que levam à disfunção cardíaca primária</li> </ul>	
<p><b>3. Hipertensão pulmonar causada por doença pulmonar e/ou hipóxia</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>3.1 DPOC</li> <li>3.2 doença intersticial pulmonar</li> <li>3.3 outras doenças de padrão misto (restritivo e obstrutivo)</li> <li>3.4 desordens respiratórias do sono</li> <li>3.5 doenças que cursam com hipoventilação alveolar</li> <li>3.6 exposição crônica a grandes altitudes</li> <li>3.7 doenças do desenvolvimento pulmonar</li> </ul>	
<b>4. Hipertensão pulmonar tromboembólica crônica</b>	
<p><b>5. Hipertensão pulmonar com mecanismos multifatoriais ou não esclarecidos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>5.1 alterações hematológicas: anemias crônicas hemolíticas, doenças mieloproliferativas, esplenectomia</li> <li>5.2 doenças sistêmicas: sarcoidose, histiocitose pulmonar, linfangioleiomiomatose</li> <li>5.3 distúrbios metabólicos: tireoidopatias, doenças de depósito</li> <li>5.4 outros: embolização tumoral, mediastinite fibrosante, insuficiência renal crônica e hipertensão pulmonar segmentar</li> </ul>	

**Tabela 1:** Classificação atualizada da hipertensão pulmonar, segundo o 5º Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar em Nice, França, em 2013. (Retirado e adaptado de PRADA *et al.*, 2014)

## 1.2. HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

### 1.2.1. Epidemiologia

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) que acometia com mais severidade preferencialmente mulheres jovens (ROBLES e SHURE, 2004), agora é diagnosticada mais frequentemente em pacientes idosos, sendo a predominância do sexo feminino bastante variável (HOEPER e GIBBS, 2014). Pode ser diagnosticada em qualquer faixa etária e independentemente do sexo (ROBLES e SHURE, 2004). Entre os idosos, a prevalência é maior na sexta década de vida. Em geral, a sobrevivência é de aproximadamente 7 anos com o tratamento, em comparação a uma sobrevida de 2,8 anos se não tratada (McGOON *et al.*, 2013). Estima-se que a HAP idiopática ocorra em torno de 10 - 52 casos por milhão de habitantes (JANSA *et al.*, 2014), com incidência de 2,4 novos casos por ano para cada 1 milhão de habitantes, não havendo predomínio étnico (VENTETUOLO e KLINGER, 2012).

Em um estudo realizado por dois grandes centros de referência em São Paulo demonstrou-se que a HAP idiopática e a associação da HAP à esquistossomose, nesta ordem, são as duas formas com maior prevalência em nosso país. Todavia, devido ao estudo não ter acontecido nas áreas endêmicas, supõe-se que o índice para HAP associada à esquistossomose seja superior ao relatado (LAPA *et al.*, 2009). Dados de um estudo recente, realizado no Instituto do Coração da Universidade de São Paulo, mostram que a idade média de pacientes com HAP no momento do diagnóstico é de 46 anos, com uma razão de

mulheres para cada homem de 3:1, sendo 28,7% com HAP idiopática e com sobrevivência de 74% em três anos (ALVES *et al.*, 2015).

A incidência verdadeira é desconhecida (SOUZA *et al.*, 2005). No Brasil, não existem dados que caracterizem a população de acometidos pela HAP (LAPA *et al.*, 2006). Apesar dos avanços de divulgação terapêutica e diagnóstica, ainda há carência de informações básicas a respeito da epidemiologia (CHIN e RUBIN, 2008), o que dificulta a capilarização do conhecimento (RUFINO *et al.*, 2013).

### **1.2.2. Definição**

A HAP, uma das classificações da HP, é uma condição rara, progressiva, debilitante e incapacitante. Apresenta-se como uma doença de remodelamento vascular que gera o aumento da RVP, levando à insuficiência ventricular direita progressiva e morte prematura (MALENFANT *et al.*, 2013). Embora a etiologia precisa permaneça desconhecida, a lesão vascular subjacente à HAP ocorre de forma idiopática, determinada por susceptibilidades genéticas ou em associação com outros estados patológicos ou exposições e é, provavelmente, uma resposta final a fatores ambientais (CHIN e RUBIN, 2008). Assim, estas classificações estão agrupadas segundo similaridades em sua fisiopatologia, anátomo-patologia e respostas ao tratamento, embora os mecanismos iniciais envolvidos no desenvolvimento da HAP e o prognóstico possam divergir (FERNANDES, 2010).

Os sinais mais comuns que levam ao indício de HAP são geralmente atribuíveis ao transporte de oxigênio prejudicado, anormalidade das trocas gasosas e a redução do débito cardíaco (DC) (GROEPENHOFF *et al.*, 2013).



Apesar de assintomática em sua fase inicial, os sintomas mais comuns são dispneia, fadiga, fraqueza, intolerância ao esforço (WEINSTEIN *et al.*, 2013), pré-síncope, síncope, angina, aumento do volume abdominal e edema periférico (SIMONNEAU *et al.*, 2004). Nos últimos anos, o antecipado reconhecimento da doença e as novas opções de tratamento, têm melhorado o prognóstico dos pacientes com HAP (YILDIZ, 2009). Contudo, devido aos sintomas serem inespecíficos, o diagnóstico da HAP comumente é realizado em fases avançadas, onde as interferências terapêuticas têm eficácia limitada e a expectativa de vida é invariavelmente reduzida (PEACOCK *et al.*, 2007). Na maioria das vezes, o diagnóstico é estabelecido quando já existe comprometimento da função ventricular direita (RUBIN, 2004). Os efeitos patológicos gerados no VD, como a hipertrofia desta câmara, resultante das doenças que afetam a função e/ou estrutura dos pulmões, caracterizam o quadro denominado *Cor Pulmonale*. A HAP, por sua vez, é sempre um mecanismo patológico subjacente ao *Cor Pulmonale* (SHUJAAT *et al.*, 2007).

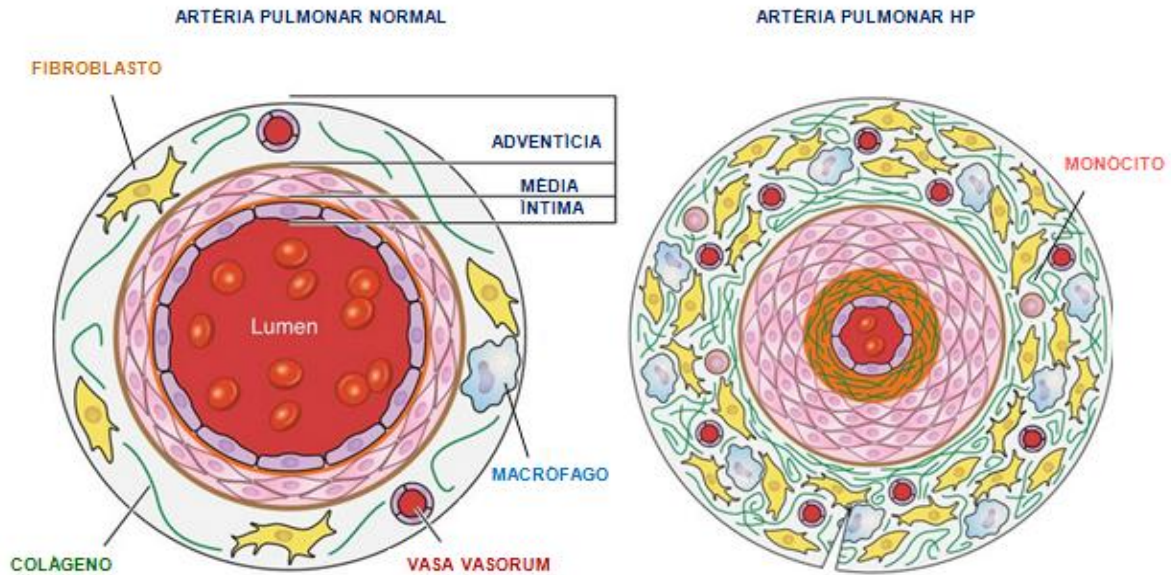
### **1.2.3. Fisiopatologia**

A circulação pulmonar é caracterizada por apresentar uma baixa pressão, ser altamente distensível, com alta capacidade e baixa resistência ao fluxo sanguíneo (CHEMLA *et al.*, 2002). A HAP é descrita como uma irregularidade circulatória caracterizada pelo aumento progressivo da velocidade do fluxo sanguíneo, aumento do tônus vascular e RVP, geralmente, em decorrência de mecanismos que envolvem vasoconstrição (BOOGARD *et al.*, 2009) e

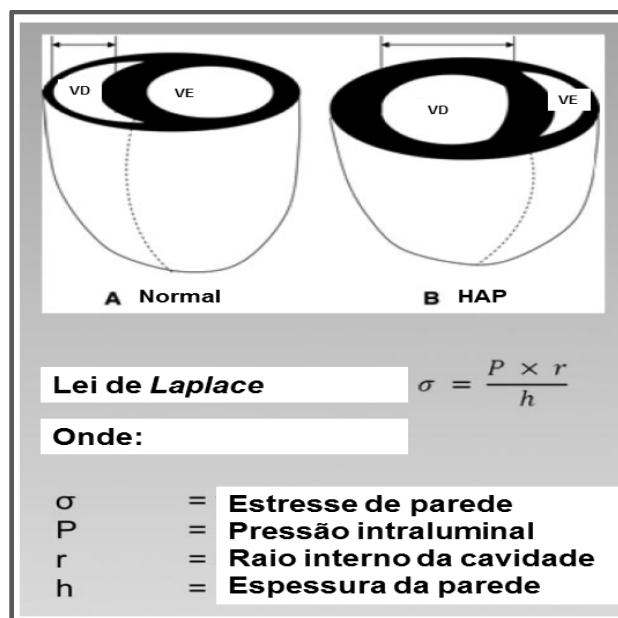
remodelamento de pequenas artérias e arteríolas pulmonares (RUNO e LOYD, 2003). Seu mecanismo patogênico preciso é desconhecido, devido a sua fisiopatologia ser multifatorial (RABINOVITCH, 2008). Contudo, sugere-se que essa resposta seja desencadeada por um sinal inflamatório inicial (LIAO, 2013), levando à superexpressão de substâncias vasoconstritoras como a endotelina-1, e a produção cronicamente prejudicada de vasodilatadores, tais como as prostaciclina e o óxido nítrico (NO) (VAILLANCOURT *et al.*, 2014). Este desequilíbrio entre vasodilatadores e vasoconstritores, promove um aumento da espessura da camada muscular lisa (túnica média), e remodelamento da membrana basal (túnica adventícia) (NEWBY, 2006). Histologicamente, a HP é caracterizada por muscularização das artérias periféricas, hipertrofia da túnica média das artérias, perda de pré-capilares no componente arterial da circulação pulmonar e a formação de neointima (AGGARWAL *et al.*, 2013) (Figura 1). Além disto, relata-se uma deposição excessiva de trombina relacionada a um estado pró-coagulante, colaborando para o aumento da RVP resultante da lesão endotelial, com formação de trombose intravascular local (SHULMAN *et al.*, 1993).

Apresentando formato diferente e menor espessura de parede em relação ao ventrículo esquerdo, o que reflete a baixa pressão na circulação pulmonar, o VD permite rápidas adaptações a alterações na pré-carga (GOMEZ-ARROYO *et al.*, 2012). Por ser formado por uma parede fina e sofrer um aumento de pressão em seu lúmen, há um aumento do estresse de parede, com conseqüente prejuízo à perfusão do miocárdio e aumento da demanda de oxigênio (McCRORY *et al.*, 2013). Para que aconteça redução deste estresse e manutenção de uma função sistólica adequada, por via compensatória, há aumento da espessura da parede

por hipertrofia, como resultado da síntese de proteínas e adição de sarcomêros em paralelo, sendo o raio interno da câmara reduzido, assumindo um formato mais arredondado (BOOGARD *et al.*, 2009) (Figura 2).



**Figura 1:** Artéria pulmonar em uma situação normal e na hipertensão pulmonar.  
(Retirado e adaptado de PUGLIESE *et al.*, 2015)



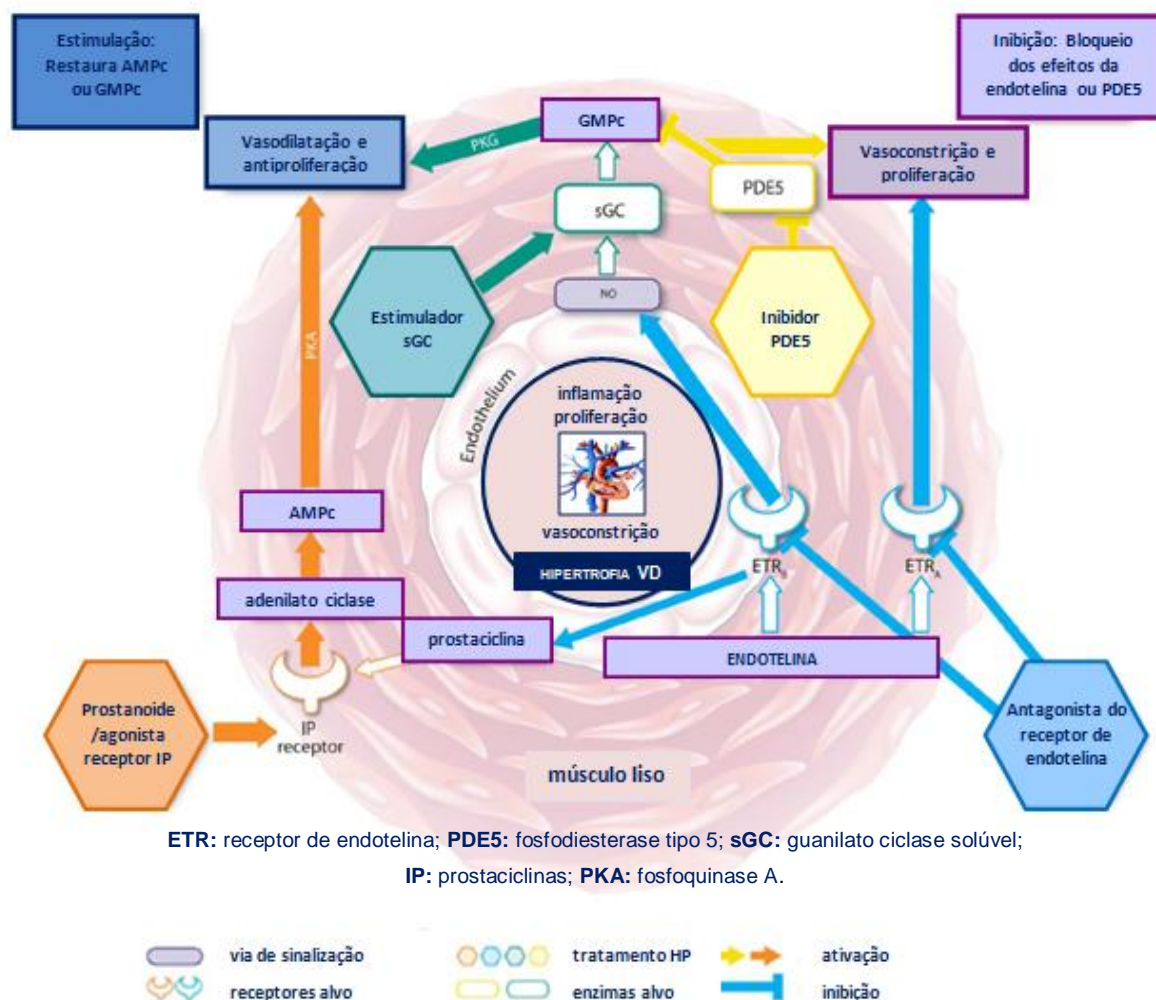
**Figura 2:** Ventrículo direito em uma situação normal e na hipertensão arterial pulmonar de acordo com a Lei de Laplace. (Retirado e adaptado de BOOGARD *et al.*, 2009)

Não sendo capaz de sustentar esta sobrecarga de pressão por longo prazo, há diminuição da força de contração cardíaca por modificações estruturais e funcionais dos cardiomiócitos, e o VD dilata (HEIN *et al.*, 2003). Por esta dilatação subsequente, há novamente aumento do estresse de parede com necessidade de maior disponibilidade de oxigênio e, simultaneamente diminuição da perfusão do VD, seguindo um ciclo vicioso que leva à diminuição da capacidade funcional com diminuição da fração de ejeção deste ventrículo (CASSERLY e KLINGER, 2009). Os mecanismos que levam da hipertrofia ventricular à dilatação não estão bem definidos, porém, acredita-se que se relacionem a modificações nas proteínas reguladoras do miocárdio, ativação neuro-hormonal, estresse oxidativo e nitrosativo, ativação do sistema imune, apoptose, entre outros (BOOGARD *et al.*, 2009).

O remodelamento ventricular em decorrência da HAP pode apresentar diferentes características estruturais e funcionais, dependendo dos estímulos e progressão da doença. Desta forma, a hipertrofia pode ser definida como adaptativa ou mal-adaptativa. A hipertrofia adaptativa é caracterizada por uma hipertrofia concêntrica, apresentando função sistólica e diastólica preservadas. Já a hipertrofia mal-adaptativa é caracterizada por hipertrofia excêntrica, com piora na função sistólica e diastólica (VONK-NOORDEGRAAF *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, a comunidade científica tem se direcionado no sentido de definir um tratamento efetivo para a HAP. As opções terapêuticas para tratamento da HAP existentes no momento são: oxigenioterapia, anticoagulantes ou agentes anti-plaquetários, fármacos vasodilatadores e opções cirúrgicas (transplante, atrioseptoplastia e tromboendartectomia) em situações específicas (MEYER *et al.*,

2004; GURTU e MICHELAKIS, 2015). No entanto, a HAP é uma doença caracterizada também por remodelamento vascular proliferativo, alterações estruturais e funcionais no VD (BOGAARD *et al.*, 2009) e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pelos cardiomiócitos (LIAO, 2013), e não somente por vasoconstrição. Portanto, as terapias utilizadas atualmente (Figura 3) promovem apenas uma melhora da qualidade de vida (McLAUGHLIN *et al.*, 2009) e não demonstram efeitos sobre o tempo de sobrevivência e sobre a reversão dessa doença (GURTU e MICHELAKIS, 2015).



**Figura 3:** Terapias atualmente recomendadas para hipertensão pulmonar e seus alvos moleculares. (Retirado e adaptado de HUMBERT e HOSSEIN-ARDESCHIR, 2015)

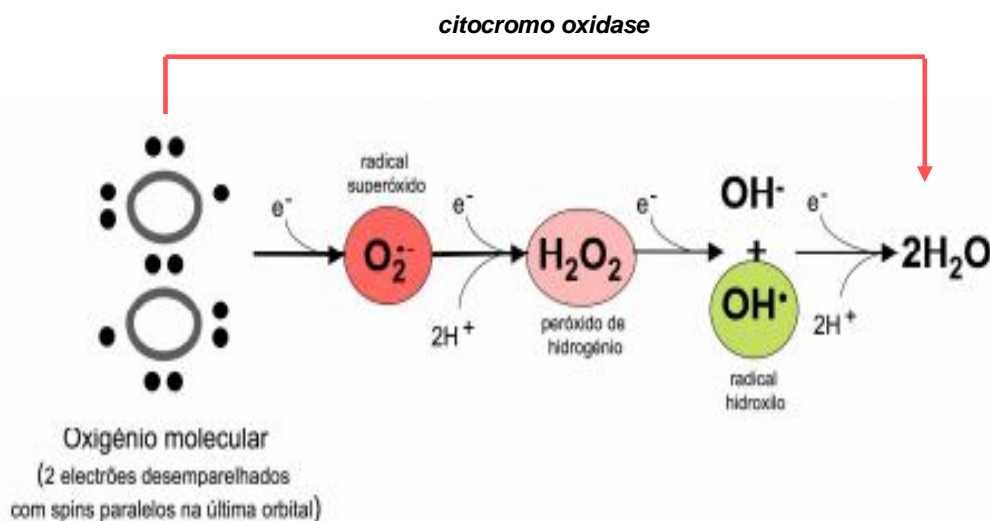
#### 1.2.4. Estresse Oxidativo

Responsáveis pela respiração celular acoplada à fosforilação oxidativa para a formação de ATP (adenosina trifosfato) e sustentação da vida dos seres aeróbicos, as mitocôndrias são as principais formadoras de radicais livres (RL) (SILVA e FERRARI, 2011). Por meio dos processos metabólicos oxidativos naturais do organismo, uma adição sequencial de elétrons leva à formação destes RL, que são caracterizados por conter número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (WILSON *et al.*, 2001). Desemparelhados na sua órbita externa, muitos deles apresentam-se com alta reatividade e instáveis, tendendo a interagir com outras moléculas na sua proximidade, por meio da captação (atuando como oxidantes) ou da cedência (atuando como redutores) de elétrons ou átomos de hidrogênio (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

O oxigênio molecular apresenta dois elétrons de spins paralelos em seu orbital mais externo, o que o torna um RL pouco reativo. Assim, o oxigênio pode receber um elétron e se tornar um forte agente oxidante (Figura 4). Para que ocorra sua completa redução, deve receber quatro elétrons de uma única vez, o que acontece com 95% do oxigênio consumido, envolvendo, assim, a redução tetravalente do oxigênio. Esta reação é catalisada pela enzima citocromo oxidase. O oxigênio restante (inferior a 5%) é reduzido de forma monovalente, gerando intermediários altamente reativos, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs) (KAUL *et al.*, 1993).

A terminologia EROs abrange espécies radicalares e outras que, embora não possuam elétrons desemparelhados são muito ativas em decorrência da sua

instabilidade. As EROs compreendem uma variedade de espécies, incluindo as formadas pela redução do oxigênio como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) e oxigênio singlet ( $^1O_2$ ) (AFANAS'EV, 2011; POLJSAK, 2011). Cada uma possui características específicas, com diferentes reatividades e tempos de meia-vida (YU, 1994).



**Figura 4:** Distribuição dos elétrons no orbital externo da molécula de oxigênio e redução da molécula à água, justificando a formação de espécies reativas de oxigênio na cadeia de transporte de elétrons. (Retirado e adaptado de FERREIRA *et al.*, 2008)

Podemos observar que os processos enzimáticos e não enzimáticos rotineiros levam à formação de EROs. Em baixas concentrações, EROs são moléculas de sinalização que promovem uma resposta adaptativa celular, resultando em citoproteção (SAMJOO *et al.*, 2013) e sobrevivência celular (TSUTSUI *et al.*, 2009). Porém sua produção excessiva ou anormal acarreta a perda do equilíbrio redox, levando ao estresse oxidativo (LEE *et al.*, 2012). O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e de defesas antioxidantes, ou seja, a produção de EROs é superior à capacidade que

o organismo tem de neutralizar os efeitos destas moléculas por meio dos antioxidantes (SIES, 1991).

Devido a constante produção de EROs, as células possuem formas de minimizar seus efeitos agressores por meio de antioxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2009). Os sistemas de proteção endógena, denominados reservas antioxidantes, podem ser enzimáticos ou não enzimáticos (FERREIRA *et al.*, 2006). Reservas enzimáticas incluem principalmente as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) (McCORD e FRIDOVICH, 1969). A redução monovalente do oxigênio molecular leva à formação do  $O_2^{\cdot-}$  (POLJSAK, 2011). Esta molécula não consegue atravessar facilmente as membranas, ficando normalmente no compartimento no qual é produzido, sendo este geralmente a matriz mitocondrial. A SOD atua dismutando o  $O_2^{\cdot-}$  em um não radical, o  $H_2O_2$  (MURPHY *et al.*, 2011). Em mamíferos, existem três diferentes isoformas da SOD: a mitocondrial que contém manganês (Mn) (Mn-SOD), a citosólica que contém cobre (Cu) e zinco (Zn) (Cu/Zn-SOD) e a extracelular que também contém Cu e Zn (EC-SOD) (POLJSAK, 2011). O  $H_2O_2$ , que pode ser formado da dismutação do  $O_2^{\cdot-}$ , apresenta meia vida longa, pode atravessar a membrana celular e percorrer grandes distâncias, gerando danos em alvos distantes de sua origem (KAUL *et al.*, 1993). A partir da oxidação de metais de transição que se encontram na sua forma livre nas proximidades, o  $H_2O_2$  é transformado em  $OH^{\cdot}$ , esta provavelmente a espécie reativa de oxigênio que mais alterações estruturais induz nos sistemas biológicos (RÄISÄNEN *et al.*, 1999). A CAT participa da eliminação do  $H_2O_2$ , promovendo a sua catálise até água (MURPHY *et al.*, 2011). A GPx utiliza a conversão da glutathiona reduzida (GSH) à

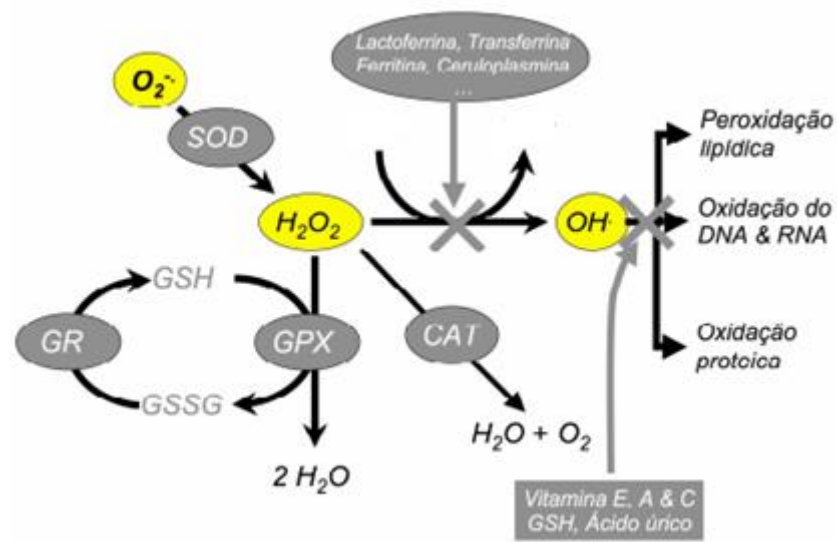


glutathiona oxidada (GSSG) para remover  $H_2O_2$  e formar água (BISWAS, 2009). Sendo assim, tanto a CAT quanto a GPx impedem o acúmulo de  $H_2O_2$  para que não haja produção de radical hidroxil, contra o qual não existe sistema enzimático de defesa (YU, 1994). Já o sistema não enzimático inclui compostos como tocoferóis, ácido úrico, flavonoides, ácido ascórbico (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000; DROGE, 2002).

As EROs exercem um papel fundamental no controle da homeostasia (VASCONCELOS, 2007), contudo, estes radicais podem facilmente causar efeitos deletérios em proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e matriz extracelular (CHRISTOPHER, 2003). A interação com lipídeos é denominada lipoperoxidação, causando modificações na permeabilidade e fluidez das membranas. Quando atingem as proteínas, são formadas proteínas oxidadas com perda estrutural e funcional (REZNICK e PACKER, 1994). Ácidos nucleicos também sofrem modificações pela oxidação, ocorrendo quebra de fita simples do DNA e mutações cromossômicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Infelizmente, ao contrário das proteínas e lipídeos, novas moléculas de DNA não podem ser formadas para substituição das lesadas (CHRISTOPHER, 2003). A sequência de reduções do oxigênio pode ser visualizada na figura 5.

EROs causam insuficiência contrátil, danos estruturais no miocárdio e remodelamento ventricular (TSUTSUI *et al.*, 2011), implicando no desenvolvimento e progressão da insuficiência cardíaca (IC) e tornando o estresse oxidativo um potencial colaborador na patogênese da disfunção ventricular direita (KHAPER *et al.*, 2010). Durante a fase inicial, na qual há sobrecarga do VD e consequente hipertrofia compensada, ocorre um aumento da reserva antioxidante com redução

do dano oxidativo (FARAHMAND *et al.*, 2004). No entanto, uma vez instalada a IC, observa-se que o estresse oxidativo é principalmente devido ao aumento da geração pró-oxidante, em vez de uma depleção dos antioxidantes (TSUTSUI *et al.*, 2009). Sugere-se que as EROs atuem como segundos mensageiros intracelulares, mediando tanto a hipertrofia adaptativa quanto a mal-adaptativa (RHEE, 1999). Assim, o estresse oxidativo tem importante papel na diferenciação, crescimento e apoptose celular, atuando sobre o crescimento e remodelamento do miocárdio através da modulação de proteínas (GIORDANO, 2005).



**Figura 5:** Ação integrada dos diferentes mecanismos antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos. (Retirado e adaptado de FERREIRA *et al.*, 2008)

### 1.2.5. Modelo Experimental de HAP

O modelo mais utilizado para demonstrar a HAP é gerado por meio da administração de monocrotalina (MCT) (POLONIO *et al.*, 2012), advinda de plantas do gênero *Crotalaria*.

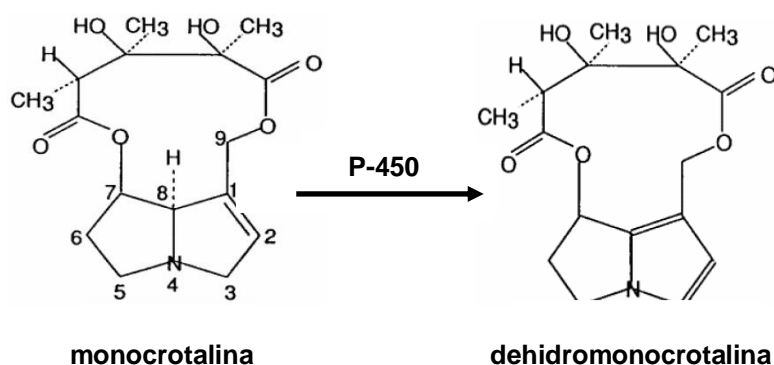
As Crotalárias pertencem à família das leguminosas (Figura 6). Com mais de seiscentas espécies crescendo abundantemente em zonas tropicais e subtropicais do mundo e mais de quarenta no Brasil (PALOMINO e VÁSQUEZ, 1991), revelam-se como plantas herbáceas com cerca de 50 cm ou arbustos com até 3 metros (FLORES e MIOTTO, 2005). Denominadas plantas invasoras que se adaptam a distintos ambientes, as Crotalárias são facilmente encontradas em plantações de grãos e em pastagens (TOKARNIA *et al.*, 2000).



**Figura 6:** Foto da vagem, das sementes e das flores das espécies pertencentes ao gênero *Crotalaria*. (Retirada de MARTINEZ *et al.*, 2013)

A monocrotalina é o principal alcaloide pirrolizidínico encontrado nestas plantas. A sua biotransformação hepática é responsável pela sua toxicidade, sendo a dehidroxilação, realizada pelo complexo enzimático citocromo P-450, uma das reações químicas envolvidas com esse processo. Após a sua dehidroxilação, o metabólito ativo dehidromonocrotalina (Figura 7), além de atuar no fígado, promove alterações estruturais e funcionais nos pulmões e na vascularização

pulmonar (DAICHO *et al.*, 2009; FARHAT *et al.*, 1993). Contudo, o grau de toxicidade varia de acordo com a idade, sexo e espécie afetada (FARAHMAND *et al.*, 2004).



**Figura 7:** Estrutura química e metabolismo da monocrotalina.

(Retirado e adaptado de PEREIRA *et al.*, 1998)

O seu mecanismo de ação pulmonar ainda não está totalmente elucidado. No entanto, sabe-se que os glóbulos vermelhos do sangue aumentam significativamente o transporte dos metabólitos da MCT do fígado para o pulmão, onde são liberados no endotélio pulmonar (PAN *et al.*, 1991). Então, por meio do desencadeamento de uma resposta inflamatória com resposta hipertrófica e hiperplásica das células musculares lisas (GOMEZ-ARROYO *et al.*, 2012), desequilíbrio entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras e elevação da pressão arterial pulmonar, a MCT torna-se uma potencial produtora de lesão das células endoteliais, levando ao surgimento progressivo de HP severa e irreversível (MEYRICK *et al.*, 1980).

Essas alterações são dependentes do tempo de análise e da dose de MCT administrada. Para melhor compreensão dos mecanismos patológicos da HAP e desenvolvimento de alternativas terapêuticas para prevenção e tratamento das

manifestações clínicas, padrões experimentais utilizando animais têm sido propostos. O modelo mais utilizado para mimetizar a HAP é gerado pela administração de MCT (POLONIO *et al.*, 2012), 60 mg/Kg (SOUZA-RABBO *et al.*, 2008), uma vez que sua aplicação é simples, oferecendo facilidade e rapidez para reproduzir o modelo e baixo custo (GOMEZ-ARROYO *et al.*, 2012). Além disso, as alterações cardiovasculares e pulmonares apresentadas são muito similares às dos pacientes com HAP (YEE *et al.*, 2000), bem como os parâmetros funcionais e bioquímicos (BROWN *et al.*, 1998). A utilização deste alcaloide tem sido realizada para induzir HAP, seguida de sobrecarga de pressão no VD, hipertrofia ventricular direita (HVD) e IC direita (RAMOS *et al.*, 2008).

Nosso grupo de pesquisa possui experiência prévia na utilização deste modelo experimental. Ao investigar a progressão da HAP em decorrência do uso de MCT em ratos machos Wistar, Leichsenring-Silva *et al.* (2011) obtiveram como resultado modificações morfológicas e funcionais do VD aos 21 dias após a injeção de MCT. No entanto, 31 dias após o início do protocolo, mudanças no ventrículo esquerdo foram encontradas, sugerindo subsequente disfunção desta câmara. No estudo desenhado para verificar se a ingestão de suco de uva, devido a suas propriedades antioxidantes, poderia modular o *Cor Pulmonale* induzido por MCT, Ludke *et al.* (2010) encontraram benefícios de proteção contra alterações da função do VD e melhora do remodelamento vascular pulmonar. Já Mosele *et al.* (2012), utilizando pré-tratamento com suco de uva, observaram atenuação da RVP, melhora em parâmetros hemodinâmicos e influência positiva na expressão de proteínas envolvidas no remodelamento cardíaco. Na investigação dos efeitos do treinamento físico sobre a hipertrofia cardíaca e estresse oxidativo em modelo

de *Cor Pulmonale* induzido por MCT, Souza-Rabbo *et al.* (2008) e Colombo *et al.* (2013) mostraram que o exercício físico é capaz de melhorar a HVD, o que está associado com a redução do estresse oxidativo e maior sobrevivência. Os dados encontrados por Siqueira *et al.* (2012), utilizando ratas Wistar ovariectomizadas, relatam que a manutenção do estrogênio fisiológico exerce influência sobre o equilíbrio redox celular, podendo atuar na prevenção do edema pulmonar tão característico desse modelo de HAP. Em recente publicação, Colombo *et al.* (2015) concluem que o treinamento físico promove uma resposta benéfica nesta patologia, diminuindo a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no VD, e conseqüentemente, a sinalização para apoptose.

### 1.3. SISTEMAS ENVOLVIDOS NO REMODELAMENTO VENTRICULAR

#### 1.3.1. Efeitos da Hiperatividade Simpática

Influenciando o sistema cardiovascular está o sistema nervoso autônomo (SNA), uma vez que, tanto a noradrenalina como a acetilcolina secretadas pelo sistema nervoso simpático (SNS) e parassimpático (SNP), respectivamente, modificam o desempenho cardíaco (ANGELIS *et al.*, 2004). A ativação destes sistemas neuro-humorais, especialmente o sistema nervoso simpático, desempenha um papel chave na progressão desfavorável da disfunção ventricular (RENDQVIST *et al.*, 1997). Apesar disso, pouca atenção tem sido dedicada ao estudo do VD, em comparação com o ventrículo esquerdo (VE). Por muitos anos, o VD foi considerado parte redundante da circulação. Hoje, porém, reconhece-se que o VD desempenha um papel dominante em diversas condições, em especial a

HP. Contudo, ainda pouco se sabe sobre o papel do SNS na IC direita, e o potencial dos beta-bloqueadores no tratamento destes pacientes permanece incerto. Mas entende-se que a modulação pelo SNA em resposta ao aumento da pós-carga é o fator prognóstico mais importante na HP (ANDERSEN *et al.*, 2015).

O SNP diminui a frequência cardíaca (FC) por meio de impulsos nervosos vagais, com mínimo efeito na contratilidade cardíaca. Isso porque os ventrículos cardíacos, cuja contração é responsável por bombear o sangue para a circulação pulmonar e circulação sistêmica, são inervados quase exclusivamente por fibras adrenérgicas (simpático) e colinérgicas (parassimpático) (ZIPES, 2008). O SNS é normalmente ativado quando receptores de estiramento (barorreceptores), localizados nos grandes vasos, detectam modificações da pressão. Em contraste, mudanças no volume sanguíneo são detectadas por receptores cardiopulmonares localizados nos átrios, ventrículos, artéria pulmonar e arteríolas pulmonares. As fibras simpáticas pós-ganglionares são noradrenérgicas e distribuem-se por todo o coração (nodo sinoatrial e atrioventricular, átrios, ventrículos, coronárias) e por todas as artérias, arteríolas, esfíncteres pré-capilares, vênulas e veias dos diferentes territórios (AYRES, 2013 e GUYTON e HALL, 2000). Portanto, enquanto a FC pode ser determinada por todo o SNA, a contração e o relaxamento cardíaco são controlados pelo SNS (LYMPEROPOULOS *et al.*, 2014).

No início da lesão miocárdica, a ativação aguda do SNS, ocorre como uma resposta adaptativa com a finalidade de restauração ou manutenção do DC, níveis pressóricos (ANGELIS *et al.*, 2004) e manutenção da homeostase cardiovascular. No entanto, a presença por longo prazo desta hiperatividade simpática sucumbe a seus efeitos deletérios e acelera a progressão da doença (TRIPOSKIADIS *et al.*,

2009). O acionamento simpático causa aumento da velocidade de despolarização diastólica com aumento da atividade do nodo sinoatrial, maior velocidade de condução, aumento do cronotropismo, lusitropismo e inotropismo cardíaco; nos vasos acarreta vasoconstrição arteriolar, redução da capacitância venosa, aumenta a RVP e renal, reduz o fluxo sanguíneo e a excreção de sódio, gerando a elevação das pressões e volumes ventriculares (IRIGOYEN *et al.*, 2001; AYRES *et al.*, 2013). Por efeito do aumento do trabalho cardíaco, estiramento mecânico e sobrecarga de pressão, há remodelamento dos miócitos, resultando em maior consumo de oxigênio (BATLOUNI e ALBUQUERQUE, 2000; OKADA *et al.*, 1995).

Favorecendo este remodelamento cardíaco e hipertrofia ventricular está a noradrenalina. Atuando por meio de alterações na transdução de sinais, estimula a expressão de fatores de transcrição e genes associados à síntese de proteínas no miócito (REMME, 2003). Além disto, a ação da noradrenalina sobre as células cardíacas estimula a produção de EROs (AMIN *et al.*, 2001). Estas espécies reativas de oxigênio também levam à redução da capacidade da circulação coronária de suprir adequadamente a parede ventricular espessada, por supressão da angiogênese. A isquemia resultante por redução da angiogênese contribui para a rápida deterioração da função do VD e HVD mal-adaptativa (SUTENDRA *et al.*, 2013). Devido à toxicidade da noradrenalina, são encontradas no miocárdio respostas como: atordoamento do miocárdio através da modificação da densidade de receptores adrenérgicos, taquicardia, arritmias ventriculares, fibrose intersticial e apoptose (GUIMARÃES *et al.*, 2002; BROURI *et al.*, 2004).

Este controle neural está fortemente relacionado à FC. A partir das informações aferentes, por meio de um sistema de estimulação e inibição,



respostas das vias simpáticas e parassimpáticas modificam a FC, conforme a necessidade do organismo em determinado momento. Como anteriormente descrito, a elevação da FC é em maior parte devido ao aumento resposta simpática e diminuição da resposta vagal (parassimpática). Alterações na FC, definidas como variabilidade da frequência cardíaca (VFC) indicam a habilidade do coração em responder aos estímulos fisiológicos e ambientais, bem como compensar os efeitos advindos de doenças. Alta VFC é sinal de boa adaptação, caracterizando mecanismos autonômicos eficientes (AUBERT *et al.*, 2003; RAJENDRA *et al.*, 2006). Relacionado com a hiperatividade simpática e diminuição da atividade parassimpática, está a redução da VFC (CASOLO *et al.*, 1992). Considerada um novo fator de risco para as doenças cardiovasculares, está a variabilidade da pressão arterial (VPA). A pressão arterial normalmente oscila, devido à interação dos sistemas neuro-humorais. No entanto, sabe-se que o aumento excessivo da flutuação da pressão sanguínea induz hipertrofia ventricular, rigidez vascular e lesão de órgãos (HÖCHT, 2013).

Desta forma, embora uma maior ativação do SNS através da hiperestimulação dos receptores beta-adrenérgicos possa ser primeiramente uma resposta adaptativa, é considerada prejudicial em longo prazo (LYMPEROPOULOS *et al.*, 2013), sendo um preditor independente de deterioração ventricular (CIARKA *et al.*, 2010). Portanto, pacientes com hiperatividade do sistema nervoso simpático e conseqüentemente com concentrações elevadas de noradrenalina apresentam menor sobrevida (BRUM *et al.*, 2002).

## 1.4. BLOQUEADORES $\beta$ -ADRENÉRGICOS NO REMODELAMENTO CARDÍACO

### 1.4.1. O Uso de Bloqueadores Beta-Adrenérgicos

Durante muitos anos, o conceito hemodinamicista da IC, com vasoconstrição ocasionando o aumento da pré e pós-carga, foi sustentado de forma dominante. Tendo como tratamento drogas inotrópicas positivas com o intuito de melhorar a contratilidade cardíaca e vasodilatadores e diuréticos para redução da sobrecarga excessiva, obteve-se redução dos sintomas, mas essas medidas não impossibilitavam o agravamento da doença. Descobriu-se então, que além das alterações hemodinâmicas, o sistema renina-angiotensina-aldosterona e o sistema nervoso simpático influenciavam na evolução da IC. Desta forma, surgiram novas possibilidades de interações medicamentosas, entre elas, os beta-bloqueadores (BATLOUNI e ALBUQUERQUE, 2000).

Até pouco tempo, o uso de beta-bloqueadores não era indicado para indivíduos acometidos por IC ou disfunção ventricular esquerda, fundamentando-se nas ações inotrópicas e cronotrópicas negativas dos beta-bloqueadores (HUNT *et al.*, 2001). Para manter seu desempenho, o coração insuficiente necessita dos estímulos beta-adrenérgicos. O uso de compostos anti-adrenérgicos leva à depressão do miocárdio e redução do DC, e a eliminação abrupta do estímulo adrenérgico pode, inicialmente, piorar o quadro de IC. Entretanto, esta resposta negativa é temporária, com o uso de doses iniciais baixas com aumento gradual (HALL *et al.*, 1995).

Segundo recomendações da I Diretriz de Insuficiência Cardíaca Crônica da Sociedade Brasileira de Cardiologia, do ano de 2014, o uso de beta-bloqueadores

determina benefícios não somente na redução dos sintomas, mas também no número de reinternações e óbitos, atuando no remodelamento reverso e redução da progressão da disfunção ventricular esquerda.

#### **1.4.2. Receptores Adrenérgicos no Controle Cardiovascular**

A atividade simpática é mediada pela produção e liberação das catecolaminas, adrenalina e noradrenalina. A maior parte das terminações sinápticas apresenta a noradrenalina como transmissor. Esta, quando liberada na fenda sináptica, ativa os receptores adrenérgicos na membrana pós-sináptica ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e também na pré-sináptica ( $\alpha_2$  e  $\beta_2$ ), causando mudanças no estado funcional das células (ATALA e CONSOLIM-COLOMBO, 2007).

Os receptores alfa ( $\alpha$ ) adrenérgicos se diferem em dois subtipos: alfa1 ( $\alpha_1$ ) e alfa2 ( $\alpha_2$ ), e os beta-adrenérgicos em: beta1 ( $\beta_1$ ), beta2 ( $\beta_2$ ) e beta3 ( $\beta_3$ ). O efeito final da ativação deste receptor depende do órgão-alvo (BORTOLOTTO e CONSOLIM-COLOMBO, 2006). O coração contém os três subtipos de receptores  $\beta$  (BRODDE, 1993). No miocárdio saudável são encontrados  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , porém havendo domínio de  $\beta_1$ . Nos átrios, 60% a 70% dos receptores são  $\beta_1$ , já nos ventrículos este percentual se eleva, com 70% a 80% de predomínio do tipo  $\beta_1$  (ATALA e CONSOLIM-COLOMBO, 2007). A isoforma  $\beta_3$  apresenta baixa expressão cardíaca e é predominantemente inativa em situações fisiológicas, parecendo determinar efeitos inotrópicos negativos nos cardiomiócitos (DEVIC *et al.*, 2001). O coração também expressa os receptores  $\alpha_1$ , embora seu papel na fisiologia cardíaca ainda esteja em debate. Em contraste, seu papel na regulação

do fluxo sanguíneo é bem conhecido (SHANNON e CHAUDHRY, 2006). Perros *et al.* (2015) e Rubin (2015) fornecem evidências de que os receptores adrenérgicos  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  atuam na geração de proliferação celular endotelial e mediadores inflamatórios na vasculatura pulmonar, atuando na gravidade hemodinâmica da HAP. As ações específicas dos principais receptores envolvidos na disfunção cardíaca estão dispostas na tabela 2.

<b>Efeitos da ativação dos diferentes receptores adrenérgicos na insuficiência cardíaca</b>	
<b>Receptores beta-1</b>	
-	Efeitos mediados pelo AMP cíclico
-	Aumento da excitabilidade e contratilidade
-	Indução de taquiarritmias
-	Hipertrofia miocárdica e remodelamento
-	Morte celular acelerada
-	Estimulação da liberação de renina
<b>Receptores beta-2</b>	
-	Efeitos mediados pelo AMP cíclico (menos intensos)
-	Indução de taquiarritmias
-	Estimulação da liberação de noradrenalina pré-sináptica
<b>Receptores alfa-1</b>	
-	Vasoconstrição (sistêmica, coronária e renal)
-	Indução de taquiarritmias
-	Hipertrofia miocárdica e remodelamento
-	Retenção de sódio e água

**Tabela 2:** Efeitos da ativação dos diferentes receptores adrenérgicos na insuficiência cardíaca.  
(Retirado e adaptado de BATLOUNI e ALBUQUERQUE, 2000)

Em decorrência da recorrente ativação do SNS, há uma redução do subtipo  $\beta_1$  se correlacionando com a gravidade da doença, efeito denominado de *down-regulation*, enquanto a densidade dos receptores  $\beta_2$  não se altera. Por conseguinte, no coração insuficiente, a proporção de receptores  $\beta_2$  aumenta consideravelmente, podendo representar até 50% do total de receptores

adrenérgicos (WALLUKAT *et al.*, 2003). A porcentagem dos receptores  $\alpha_1$  varia de 2% a 23%, e apresenta um aumento na IC, contudo permanece bem inferior à porcentagem dos beta-receptores (BATLOUNI e ALBUQUERQUE, 2000). Estas mudanças podem ser interpretadas como um mecanismo de proteção contra os efeitos prejudiciais da noradrenalina. No entanto, eles levam a uma maior deterioração cardíaca, uma vez que o coração inativa suas estratégias de manutenção de uma função sistólica adequada. Estratégias terapêuticas podem atuar no bloqueio adrenérgico, para que não ocorra esta perda de sensibilidade (LOHSE *et al.*, 2003).

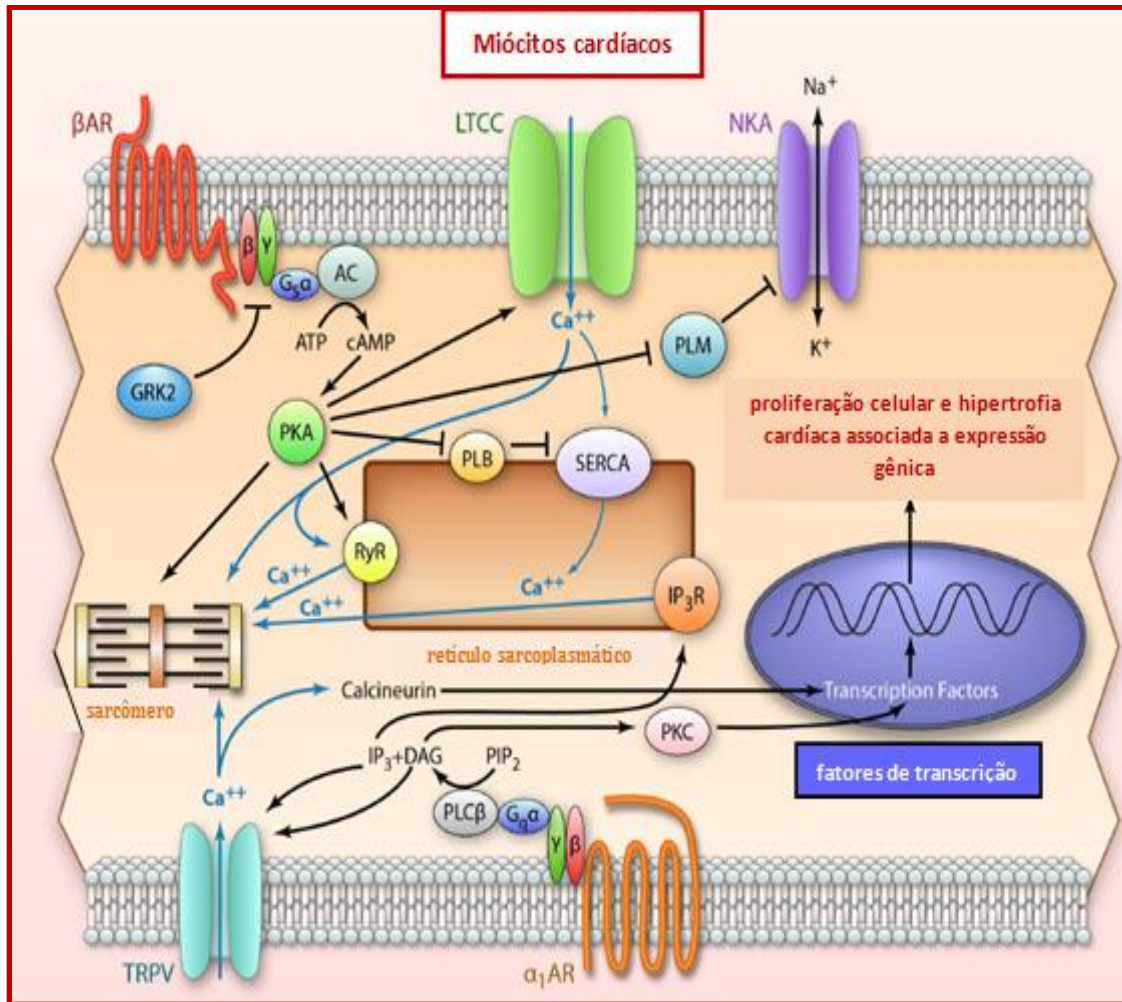
#### **1.4.3. Mecanismo de Ação dos Beta-Bloqueadores**

Os receptores beta-adrenérgicos são ligados à proteína G e apresentam sete domínios transmembrana (NETO *et al.*, 2006). Após sua ativação por agonistas específicos, a subunidade  $G_\alpha$  da proteína G catalisa a mudança do GDP (guanosina difosfato) por GTP (guanosina trifosfato), gerando a dissociação desta proteína. Então, a subunidade  $G_\alpha$  desloca-se para ativar a enzima adenilato-ciclase (AC) e estimula o aumento substancial da concentração de adenosina 3',5' - monofosfato cíclico (AMPc) (FRAGOSO, 2002). Quando em elevadas concentrações, o AMPc intracelular pode ocasionar a ativação da holoenzima proteína quinase A (PKA) na sua sub-unidade regulatória, liberando a sub-unidade catalítica para o citosol (SILVA *et al.*, 2009). Acionada, a PKA estimula o metabolismo dos miócitos e gera aumento da entrada de cálcio no citosol durante a despolarização celular, sendo capaz de regular a contratilidade

miocárdica (GERHARDSTEIN *et al.*, 1999) (Figura 9). Através da fosforilação da fosfolambam (PLB), permite que ocorra a recaptação de cálcio pela bomba SERCA. Pela fosforilação da troponina I, reduz a afinidade do cálcio no complexo actina-miosina. Como consequência, a estimulação da via receptor beta-adrenérgico aumenta a força de contração, acelera a contração e diminui o tempo do relaxamento cardíaco (Figura 8).

O uso de beta-bloqueadores pode preservar a estrutura e função do miocárdio devido à diminuição de AMPc (STRANG *et al.*, 1994; WERSTIUK e LEE, 2000). O bloqueio beta-adrenérgico pode, além disso, induzir efeitos antiarrítmicos devido à diminuição da FC; adequar os efeitos eletrofisiológicos através da diminuição da automaticidade; prevenir a hipocalcemia (BOSCO e BRAZ, 2001); reajustar a sensibilidade dos barorreceptores; aumentar o tônus parassimpático, reduzir a taquicardia (CHIZZOLA *et al.*, 2006); inibir a formação da renina e a atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona, atuando conjuntamente com os inibidores da enzima de conversão da angiotensina (BATLOUNI e ALBUQUERQUE, 2000).

A administração de beta-bloqueadores por longo prazo pode efetivamente inverter o processo de remodelamento ventricular, mediante a redução progressiva dos volumes ventriculares e da massa miocárdica, ocasionando, assim, melhora da função sistólica (PERRINO e ROCKMAN, 2007; DUARTE *et al.*, 2009; PU *et al.*, 2013).



**Figura 8:** Contração dos miócitos cardíacos e sua regulação por receptores adrenérgicos cardíacos. (Retirado e adaptado de LYMPEROPOULOS *et al.*, 2013)

DAG: 2-diacilglicerol; GRK: receptor de quinase acoplado a proteína G; IP<sub>3</sub>R: receptor IP<sub>3</sub>; IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato; LTCC: canal de cálcio do tipo L; NKA: Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase; PIP<sub>2</sub>: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PKC: proteína quinase C; PLB: fosfolamban; PLC: fosfolipase C; PLM: fosfoleman; RyR: receptor de rianodina; SERCA: sarco / retículo endoplasmático Ca<sup>2+</sup> - ATPase; TRPV: potencial receptor transiente vanilóide

#### 1.4.4. A Utilização dos Beta-Bloqueadores na Prática Clínica

Apesar dos comprovados benefícios da utilização dos beta-bloqueadores, existem controvérsias quanto à seleção de um particular bloqueador  $\beta$  para o tratamento da IC (CHARTTERJEE *et al.*, 2013). Black-Maier *et al.* (2015)

apresentam como principais beta-bloqueadores: metoprolol, atenolol, carvedilol, bucindolol, bisoprolol e nevigolol. As diferenças mais relevantes relacionam-se à seletividade aos receptores e as propriedades agregadas que cada um possui.

Chatterjee *et al.* (2013) realizaram uma revisão sistemática e meta-análise referente à eficácia dos diferentes beta-bloqueadores na IC, envolvendo 21 estudos. Na análise geral, melhoras na fração de ejeção ventricular esquerda foram semelhantes independentemente do fármaco utilizado. Porém, ao se referir à mortalidade, todos os beta-bloqueadores mostraram melhoria, mas o maior efeito foi observado com carvedilol. Segundo Ruwald *et al.* (2013), é com o uso de carvedilol que está associado o menor número de internações. Acredita-se que o bloqueio total dos receptores adrenérgicos, levando ao benefício máximo do bloqueio simpático, além das implicações resultantes do bloqueio  $\alpha$  e da capacidade antioxidante, podem explicar os melhores resultados encontrados com o carvedilol quando comparado a outros beta-bloqueadores (BATLOUNI e ALBUQUERQUE, 2000).

Uma das razões pela qual as diretrizes atuais relutam em utilizar inibidores neuro-hormonais para o tratamento da HAP é o temor de hipotensão sistêmica ou os efeitos inotrópicos negativos agudos, que inibidores neuro-hormonais são conhecidos por induzir (GALIÈ *et al.* 2009). Além disso, pacientes com HAP são altamente dependentes do ritmo cardíaco para aumentar seu DC (MAN e HANDOKO, 2015). São escassos os dados disponíveis na literatura abordando o uso de beta-bloqueadores na HAP (BRANDYOPADHYAY *et al.*, 2015).

Em estudo de HAP experimental, o tratamento com o beta-bloqueador bisoprolol apresentou-se eficaz em retardar a IC, através da melhora da



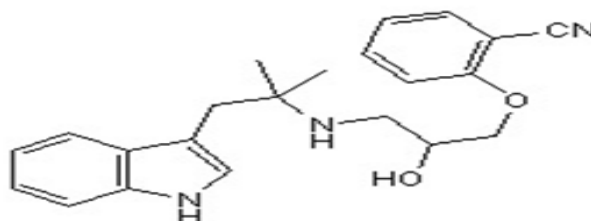
contratilidade, redução da fibrose e inflamação do miocárdio (MAN *et al.*, 2011). Através do estudo de coorte de Petsey *et al.* (2012) com 94 pacientes com HAP divididos em dois grupos, com e sem o uso de beta-bloqueador, concluiu-se que não houve diferenças significativas entre os grupos na hemodinâmica pulmonar e função cardíaca. Para Van Campen *et al.* (2014), a terapia com beta-bloqueador é totalmente tolerada por pacientes com HAP. Em seus resultados, o bisoprolol atuou na melhora da fração de ejeção do VD. O grupo de pesquisa de Okumura em recente publicação (2015) demonstra que o tratamento com carvedilol, em modelo de HAP de ratos Sprague-Dawley, reduziu o teor de colágeno cardíaco, expressão de fatores de crescimento e HVD. Contudo, não foi eficaz na redução da pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD) e desencadeou queda da FC.

Segundo estudo realizado por Bandyopadhyay *et al.* (2015), devido a resultados controversos, pouco se sabe sobre a frequência da utilização de beta-bloqueadores e do papel exato do bloqueio nestes pacientes. Sendo assim, não existem atualmente evidências clínicas de que beta-bloqueadores devam ser utilizados para o tratamento da insuficiência cardíaca à direita (MAN e HANDOKO, 2015).

#### **1.4.5. Beta-bloqueador Bucindolol**

Bucindolol (BCD) é um beta-bloqueador altamente lipofílico (Figura 9), metabolizado pelo fígado por meio do citocromo P450, principalmente a isoforma 2D6, semelhante à maioria dos outros beta-bloqueadores (BRISTOW, 2000). Liga-se extensamente às proteínas (87%), com meia-vida de cerca de 8 horas

(GOODMAN e GILMAN'S, 2012). Denominado um bloqueador de terceira geração, não seletivo, atua em receptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e apresenta atividade antagonista  $\alpha_1$  adicional (Tabela 3), contribuindo para um efeito vasodilatador. Seu perfil de atividade neuro-hormonal é muito semelhante ao do carvedilol (BRISTOW, 2000), mas diferem quanto às propriedades antioxidantes (Tabela 4) (BATLOUNI E ALBUQUERQUE, 2000), devido ao carvedilol aumentar a disponibilidade do NO (VANHOUTEE e GAO, 2013). Sua capacidade de apresentar ou não atividade simpatomimética intrínseca no miocárdio humano, controverso entre os autores, não apresenta nenhuma evidência (BLACK-MAIER, 2015).



**Figura 9:** Estrutura química do bucindolol.

2-[2-hydroxy-3-[[1-(1H-indol-3-yl)-2-methylpropan-2-yl]amino]propoxy]benzonitrile

(Retirado de Santa Cruz Biotechnology - <http://www.scbt.com/datasheet-203860-bucindolol.html>)

Comparação farmacodinâmica dos principais beta-bloqueadores				
$\beta$ -bloqueador	$\beta_1$ antagonista	$\beta_2$ antagonista	$\alpha_1$ antagonista	redução NE sistêmica
Metoprolol	++++	++	0	0
Atenolol	++++	++	0	0
Carvedilol	++++	++++	+++	0
Bucindolol	++++	++++	+	+++
Bisoprolol	++++	+	0	0
Nebivolol	++++	0.5+	0	0

**Tabela 3:** Comparação farmacodinâmica dos principais beta-bloqueadores.

(Retirado e adaptado de BLACK-MAIER *et al.*, 2015)

Propriedades farmacológicas dos beta-bloqueadores mais utilizados no tratamento da insuficiência cardíaca				
	Bloqueio $\beta$ 1	Bloqueio $\beta$ 2	Bloqueio $\alpha$ 1 vasodilatação	Ação antioxidante
Metoprolol	++	-	-	-
Bisoprolol	++	-	-	-
Bucindolol	++	+	+ (vd)	-
Carvedilol	++	++	+ ( $\alpha$ 1)	+

vd- vasodilatação direta.

**Tabela 4:** Comparação da propriedade antioxidante dos principais beta-bloqueadores.  
(Retirado e adaptado de BATLOUNI e ALBUQUERQUE, 2000)

BCD apresenta duas características únicas em comparação a outros beta-bloqueadores. A primeira é a sua propriedade simpatolítica, ou seja, reduz os níveis e o efeito da noradrenalina sistêmica (Tabela 3) de pacientes com IC (BLACK-MAIER *et al.*, 2015). Sabe-se que o aumento dos níveis de noradrenalina plasmática se relaciona com pior desempenho cardíaco e com a gravidade desta doença (COHN *et al.*, 1984), bem como o desencadeamento de fibrilação atrial (BLACK-MAIER *et al.*, 2015). A segunda característica é que variações genéticas no receptor adrenérgico  $\beta$ 1, bem como em um modificador do mecanismo de sinalização para a liberação da noradrenalina, modificam a resposta simpatolítica (ALEONG *et al.*, 2013). Estes polimorfismos poderiam ser responsáveis por uma resposta exacerbada do fármaco (O'CONNOR *et al.*, 2012). Houve a aprovação do U.S. Food and Drug Administration (FDA) para o uso do BCD na IC em conjunto ao teste genético para avaliação do polimorfismo Arg389Gly dos receptores  $\beta$ 1, o qual identifica os indivíduos que não responderiam adequadamente a este tipo de beta-bloqueador. Devido à família de receptores

beta-adrenérgicos ser altamente polimórfica, BCD tem o potencial de ser o primeiro tratamento direcionado a doenças cardiovasculares com alvos geneticamente específicos, evitando assim que os efeitos colaterais que se sobressaiam aos benefícios (PEREIRA *et al.*, 2010).

Eichhorn *et al.* (1990) descrevem que o bloqueio adrenérgico com BCD melhora a função contrátil do miocárdio, mantendo o consumo de oxigênio inalterado. Posteriormente, Eichhorn (1993) refere melhoria na função sistólica e diastólica do VE, e redução da pressão arterial pulmonar.

## 2. JUSTIFICATIVA

A HAP consiste em uma doença de progressão rápida e letal (MALENFANT *et al.*, 2013), decorrente de uma doença vascular pulmonar moldada pela ação sinérgica de fatores genéticos, epigenéticos e relacionados ao sistema imunológico (BOGAARD *et al.*, 2009). Sendo assim, é resultante de complexa fisiopatologia multifatorial (CHAN e LOSCALZO, 2008). Caracteriza-se patologicamente por uma anormalidade circulatória, decorrente do aumento da velocidade do fluxo sanguíneo, aumento do tônus vascular, desequilíbrio de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras (BOGAARD *et al.*, 2009) e proliferação neointimal progressiva que impulsiona lesões vaso-oclusivas (TUDER *et al.*, 2009), acarretando como resultado o remodelamento da parede vascular com aumento progressivo da RVP (GRUNING *et al.*, 2011). Em decorrência, há elevação da pós-carga imposta ao VD, gerando consequente hipertrofia, dilatação (CASSERLY e KLINGER, 2009) e IC direita (HANDOKO *et al.*, 2009). Com o aumento de consumo de oxigênio pelo miocárdio (CASSERLY e KLINGER, 2009), é provável que o estresse oxidativo participe do desenvolvimento e progressão desta doença (TSUITSUI *et al.*, 2011). Igualmente importante nas causas deste remodelamento progressivo e declínio da função miocárdica está o aumento da atividade simpática, sendo a hiperatividade do sistema neuro-hormonal uma das respostas encontradas mais precocemente (VANHOUTTE e GAO, 2013). Apesar dos avanços, a HAP continua a ser uma doença fatal (WEINSTEIN *et al.*, 2013), e a função do VD é a maior determinante da capacidade funcional e prognóstico (VOELKEL *et al.*, 2006).

Contudo, ainda há escassos estudos referentes a estratégias de tratamento específicas para precaver ou reverter a disfunção cardíaca direita apresentada pelos indivíduos com HAP. Sabe-se que bloqueio beta-adrenérgico diminui aproximadamente 30% da mortalidade de pacientes com IC esquerda, porém pouquíssimas pesquisas referem sua utilização na IC direita pela HP (BOGAARD *et al.*, 2010; BANDYOPADHYAY *et al.*, 2015). Modelos experimentais demonstram benefícios do uso de beta-bloqueadores na HAP, contudo, as respostas encontradas são incertas (MAN *et al.*, 2012; BOGAARD *et al.*, 2010). Não obstante a evidência substancial de seus efeitos benéficos, seu uso atualmente não é recomendado (GALIE *et al.*, 2009; MAN *et al.*, 2015).

Considerando os benefícios hemodinâmicos, eletrofisiológicos e, principalmente neuro-hormonais do beta-bloqueador BCD, o presente estudo visa avaliar o efeito deste bloqueador, que oferece bloqueio absoluto dos receptores adrenérgicos e não apresenta propriedades antioxidantes, no remodelamento ventricular direito e progressão da doença.

### **3. FORMULAÇÃO DO PROBLEMA**

Qual o efeito da administração do beta-bloqueador bucindolol sobre a HVD e IC direita em ratos Wistar com HAP, induzida pela administração de monocrotalina?

### **4. HIPÓTESE**

O bucindolol reduz a HVD e IC direita decorrente da HAP induzida pela droga monocrotalina, por meio do bloqueio simpático e da atenuação do desequilíbrio redox, responsáveis estes pela melhora funcional do VD.

### **5. OBJETIVOS**

#### **5.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o desempenho do beta-bloqueador bucindolol na modulação da atividade autonômica e no remodelamento cardíaco, por meio da avaliação de parâmetros hemodinâmicos, funcionais, estruturais e de estresse oxidativo no modelo experimental de HAP induzida por monocrotalina.

#### **5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Mensurar semanalmente o ganho de massa corporal dos animais.

- Quantificar os seguintes índices morfométricos: congestão hepática, congestão pulmonar e hipertrofia ventricular direita.
- Avaliar o perfil hemodinâmico por meio das medidas da pressão ventricular sistólica e diastólica final do VD, da pressão da artéria pulmonar, e determinar o índice de contratilidade ( $dP/dt_{máx}$ ) e relaxamento do VD ( $dP/dt_{mín}$ ).
- Verificar as modificações induzidas pela monocrotalina e pelo bucindolol por meio de ecocardiografia transtorácica, avaliando parâmetros de função sistólica e diastólica, RVP e índice de performance do miocárdio (IPM).
- Avaliar a função autonômica cardíaca e vascular por meio dos componentes simpático e parassimpático, VFC, VPA e balanço simpatovagal.
- Verificar a influência do tratamento sobre as concentrações de  $H_2O_2$ , a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, GPx e CAT) e o dano oxidativo a lipídios em homogeneizado do VD de ratos com HAP.



## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1. ANIMAIS

Foram utilizados 36 ratos Wistar machos pesando de  $130 \pm 10$  gramas provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Os animais foram mantidos em caixas plásticas (15 x 32 x 39 cm), com quatro animais por caixa, sob condição padrão de biotério: ração comercial (Nuvilab CR-1) e água *ad libitum*, umidade controlada (70%), ciclo “claro-escuro” de 12 horas e temperatura controlada (20-25°C).

### 6.2. CÁLCULO AMOSTRAL

O cálculo do tamanho amostral foi efetuado por meio do programa *Sigma Plot 11.0*. No cálculo foram considerados probabilidade de erro  $\alpha = 0.05$  e poder do teste estatístico de 0.95, sendo o parâmetro utilizado a PDFVD (pressão diastólica final do VD) (LÜDKE *et al.*, 2010). O n calculado foi de 8 animais por grupo, totalizando 32 amostras para quatro grupos. Considerando a estimativa de perda de 25% dos animais no período de desencadeamento da doença (SOUZA-RABBO *et al.*, 2008), foram adicionados 8 animais ao tamanho amostral (inseridos nos grupos que receberam a monocrotalina), totalizando 40 animais.

### 6.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para o desenvolvimento desta pesquisa, quatro grupos experimentais foram estabelecidos:

**Controle sem bucindolol (CTR SEM BCD):** animais que receberam a administração de solução salina e receberam o tratamento com veículo;

**Controle bucindolol (CTR+BCD):** animais que receberam a aplicação de solução salina e foram submetidos ao tratamento com bucindolol;

**Monocrotalina sem bucindolol (MCT SEM BCD):** animais que receberam a administração de monocrotalina e receberam o tratamento com veículo;

**Monocrotalina bucindolol (MCT+BCD):** animais que receberam a aplicação de monocrotalina e foram submetidos ao tratamento com bucindolol.

### 6.4. BIOÉTICA COM OS ANIMAIS

Todos os procedimentos experimentais desenvolvidos no presente estudo estão de acordo com a Lei Arouca (Lei nº 11.794), com as Diretrizes para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos, de 2013, e com as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA - 2013 (Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal). Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, através do número de aprovação: 26244.

## 6.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

### 6.5.1. Ambientação dos Animais

Os animais permaneceram 7 dias em ambientação, no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Após este período, a administração de monocrotalina foi efetuada.

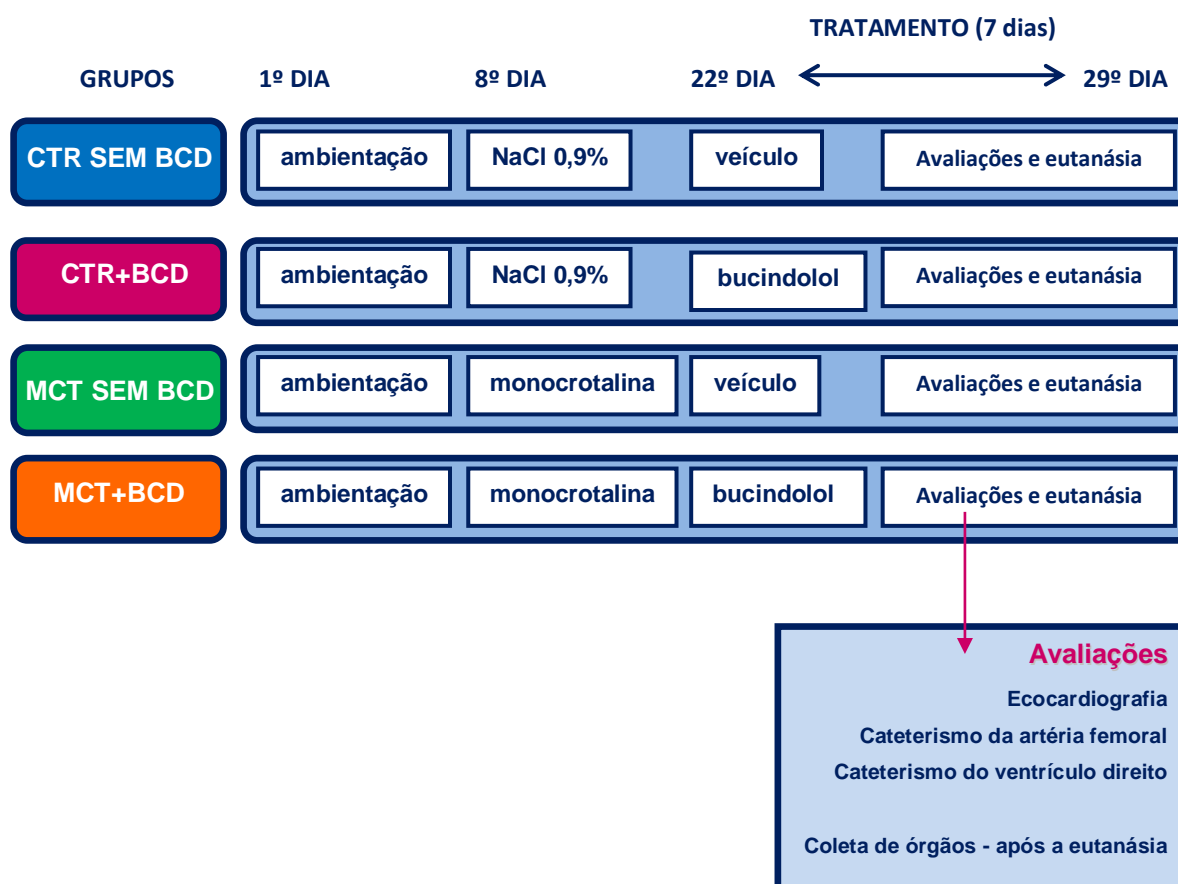
### 6.5.2. Administração da Monocrotalina

Os animais receberam uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de monocrotalina (60 mg/Kg) (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EUA) ou solução salina 0,9% (pH 7,4) no mesmo volume (WERCHAN *et al.*, 1989), sendo a preparação realizada de acordo com Singal *et al.* (2000). A diluição da monocrotalina, sendo 60 mg para 1 mL de volume final, foi feita em 0,5mL de HCl 1N. Após solubilizar, o pH foi ajustado até atingir 7,4 com a adição de NaOH 1N e para complementar até o volume final foi acrescentado NaCl 0,9%. Para um rato de 180 gramas, por exemplo, foi administrado 180 µL de solução, não alterando, portanto, a sua volemia (WERCHAN *et al.*, 1989). Após a indução da HAP, os animais foram pesados e acompanhados por 14 dias.

### 6.5.3. Administração do Beta-bloqueador Bucindolol

Após duas semanas da administração da monocrotalina, os animais foram submetidos ao tratamento com o beta-bloqueador bucindolol (2 mg/Kg) (Santa

Cruz Biotechnology; CA, EUA), sendo a preparação adaptada de Baker *et al.* (2011). Este, foi administrado uma vez por dia via i.p., durante 7 dias. Para um animal de 250 gramas, para exemplificar, foi administrado 0,5 mL de solução. Segundo Rhoden e Rhoden (2006), quantidades tão elevadas quanto 10 mL/100 gramas de massa corporal podem ser administrados via i.p.; deste modo, nos mantivemos bem inferior à margem de segurança com administração de volumes menores. Os animais que não pertenciam aos grupos que receberam bucindolol foram submetidos ao tratamento com veículo (1% DMSO, 2% Tween 20, NaCl 0,9%) no mesmo volume.



**Figura 10:** Desenho experimental do estudo.

## 6.6 ANÁLISES FUNCIONAIS, HEMODINAMICAS E ESTRUTURAIIS

### 6.6.1. Avaliação Ecocardiográfica

Após 7 dias de tratamento com o beta-bloqueador, os animais foram anestesiados com quetamina (90 mg/Kg – i.p.) e xilazina (10 mg/Kg – i.p.), tricotomizados na região ventral do tórax e então posicionados para a avaliação ecocardiográfica. As imagens foram obtidas através do modo bidimensional, modo M e do doppler pulsado (Sistema de Ultrassom Philips HD7; Andover, MA, USA), utilizando um transdutor piezoelétrico setorial S12-4 (Philips; Andover, MA, USA). Os seguintes parâmetros foram avaliados: diâmetro diastólico do VD (DdVD), diâmetro sistólico do VD (DsVD), área do VD na diástole, área do VD na sístole, DC do VD, volume sistólico (VS) do VD, excursão sistólica do plano do anel da tricúspide (TAPSE), fração de encurtamento (FEC) do VD, mudança de área fracional (MAF) do VD, índice de performance miocárdica (IPM), RVP através da relação entre o tempo de aceleração e o tempo de ejeção (TAC/TEJ) do fluxo de sangue pela artéria pulmonar e a relação entre a velocidade máxima do enchimento rápido e lento do ventrículo direito (E/A) (RUDSKI *et al.*, 2010; URBONIENE *et al.*, 2010; JONES *et al.*, 2002). Os seguintes cálculos foram realizados:

$$1. VS = AP_{csa} (2D) \times VTI \text{ (doppler)}, DC = VS \times FC$$

$AP_{csa}$ : área de secção transversal da artéria pulmonar;

FC: frequência cardíaca medida no momento de fluxo pela artéria pulmonar.

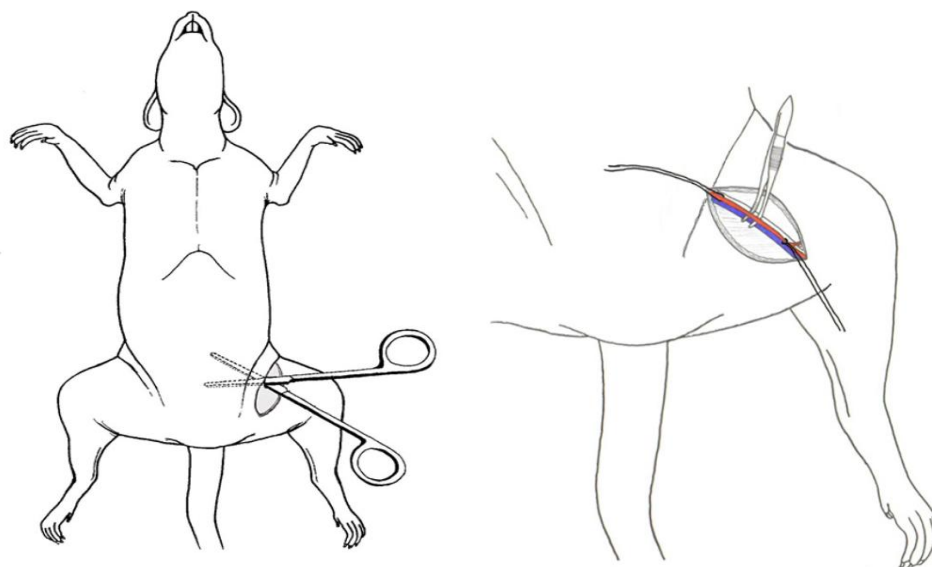
$$2. AP_{csa} = (AP_d/2)^2 \times 3,14$$

$AP_d$ : diâmetro da artéria pulmonar durante a sístole ventricular;

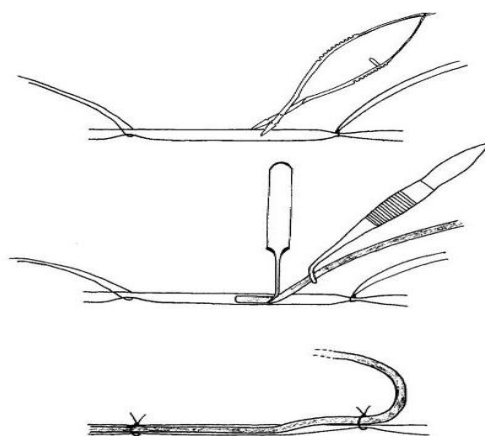
3.  $MAF = (\text{área diastólica final do VD} - \text{área sistólica final do VD} / \text{área diastólica final do VD}) \times 100$
4.  $FEC = (\text{diâmetro diastólico final do VD} - \text{diâmetro sistólico final do VD} / \text{diâmetro diastólico final do VD}) \times 100$
5.  $IPM = (\text{tempo de fechamento da valva tricúspide} - \text{tempo de ejeção pela artéria pulmonar}) / \text{tempo de ejeção pela artéria pulmonar}$

### **6.6.2. Avaliação Hemodinâmica – Cateterismo Artéria Femoral**

Após a ecocardiografia, ainda sob os efeitos do anestésico geral, os animais foram encaminhados para a realização do cateterismo da artéria femoral. Iniciamos com a imobilização do animal em uma prancha operatória, posicionando-o em decúbito dorsal, com seus membros superiores e inferiores fixados em abdução com fita crepe. Realizou-se a tricotomia, antissepsia com álcool 70% e, posteriormente, uma incisão entre o quadrante medial superior e inferior na região proximal do membro inferior direito. O tecido adjacente foi então divulsionado até que a artéria femoral, veia femoral e nervo femoral fossem expostos. Na sequência, a artéria e a veia femoral foram separadas do nervo, e separadas entre si (Figura 11). Na artéria femoral, através da utilização de uma tesoura oftálmica, realizou-se um corte no ângulo de 45°. Uma cânula de polietileno P-10 de 5 cm previamente soldado a um tubo de Tygon<sup>®</sup> de 16 cm preenchida com NaCl 0,9%, foi inserida no lúmen da artéria, sendo fixada com o auxílio de um fio de algodão (JESPERSEN *et al.*, 2012) (Figura 12).



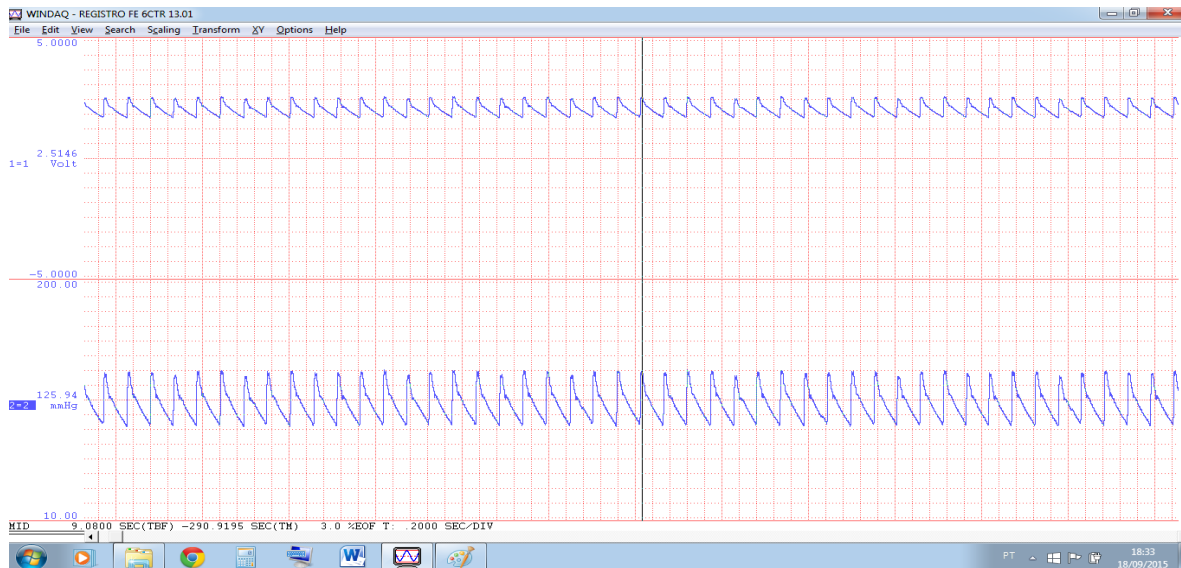
**Figura 11:** Incisão e dissecção do tecido conjuntivo e muscular para expor a artéria femoral, seguida pela separação da artéria e veia femoral. (Retirado de JESPERSEN *et al.*, 2012)



**Figura 12:** Inserção do cateter através da incisão no vaso, seguida pela sutura do cateter no local. (Retirado de JESPERSEN *et al.*, 2012)

A parte de maior calibre da cânula, composta pelo tubo Tygon<sup>®</sup>, foi conectada a um transdutor de pressão (Strain-Gauge / Narco Biosystem Pulse Miniature Transducer PR-155; Houston, TX - EUA) interligado a um amplificador de sinais (Windaq – taxa de amostragem de 2000Hz / Pressure Amplifier HP

8850C) para que a monitorização da pressão arterial (sistólica e diastólica) fosse realizada (LÜDKE *et al.*, 2010). Os sinais analógicos destas pressões foram digitalizados (Windaq-Data Acquisition System; Akron, Ohio - EUA) e expressos em mmHg (LÜDKE *et al.*, 2010) (Figura 13).



**Figura 13:** Pressão arterial, obtida através do cateterismo da artéria femoral.

Através da análise espectral, decompomos o sinal de pressão e identificamos a modulação exercida pelos sistemas simpático e parassimpático sobre a FC e pressão arterial, demonstrando qual componente está mais atuante no sistema cardíaco e vascular (KARLEN-AMARANTE *et al.*, 2012). Para esta análise, foi utilizado o modelo auto-regressivo aplicado a séries temporais de 250 batimentos cardíacos (ACHARYA *et al.*, 2006). A FC foi automaticamente calculada através do intervalo de tempo entre dois picos sistólicos consecutivos ou intervalos de pulso. Neste estudo, dois componentes espectrais foram considerados: baixa frequência (LF), 0,10-1,00 Hz e alta frequência (HF), 1,00-



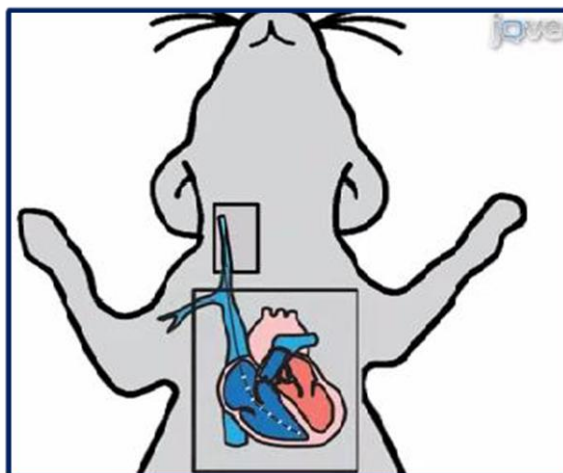
5,00 Hz (MONTANO *et al.*, 1994). Os espectros foram avaliados quantitativamente, considerando: HF (atividade parassimpática), LF (atividade simpática), LF/HF (balanço simpátovagal), VFC e VPA. Os componentes espectrais foram expressos em valores absolutos e unidades normalizadas (nu) (MONTANO *et al.*, 1994).

### 6.6.3. Avaliação Hemodinâmica – Cateterismo Ventrículo Direito

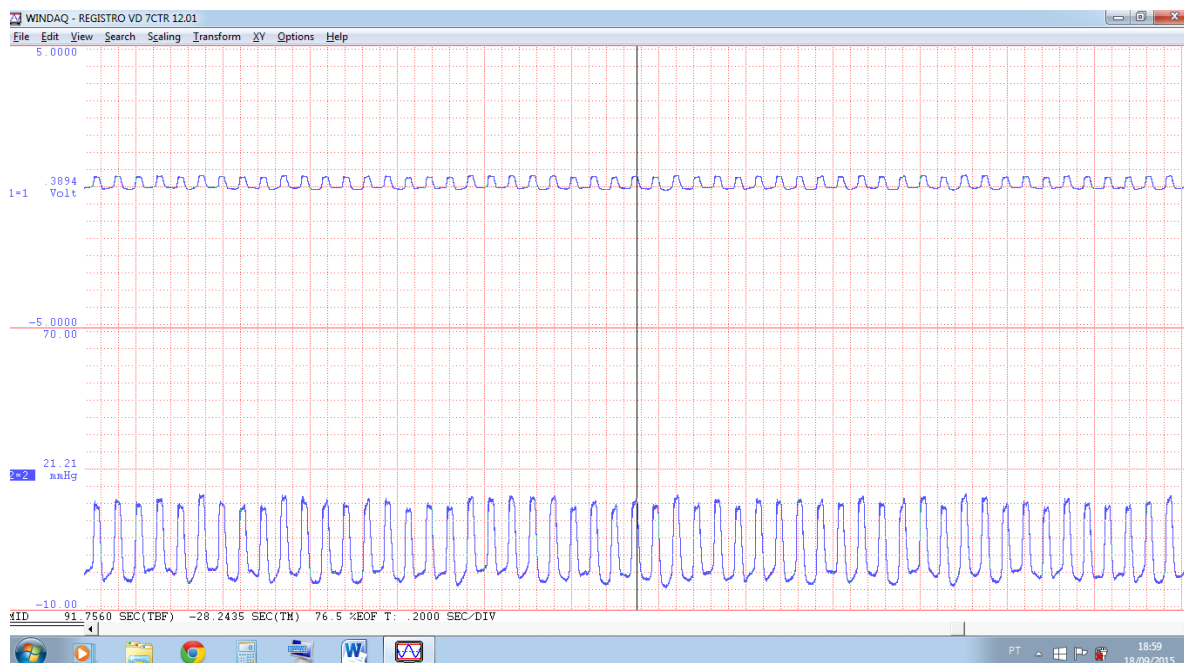
Realizado o cateterismo da artéria femoral, deu-se início ao cateterismo da veia jugular. O animal permaneceu contido na prancha operatória, e após a tricotomia e assepsia com álcool 70% realizou-se a exposição da veia jugular direita. Nesta, através da utilização de uma tesoura oftálmica, realizou-se um corte no ângulo de 45°. Uma cânula preenchida com NaCl 0,9%, composta por tubo de polietileno PE-50 foi inserido na veia e introduzido até o VD (Figura 14). Este cateter foi conectado ao transdutor de pressão, para que a monitorização da PSVD e PDFVD fosse realizada. Os sinais analógicos destas pressões foram digitalizados (Windaq-Data Acquisition System) e expressos em mmHg (LÜDKE *et al.*, 2010) (Figura 15).

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 ( $dP/dt_{\text{máx}}$ ) e negativos da derivada de relaxamento ( $dP/dt_{\text{min}}$ ). Estes foram expressos em mmHg/s (SOUZA-RABBO *et al.*, 2008). Para estimar a PAP, foi utilizada a fórmula:  $PAP \text{ (mmHg)} = 0,61 \times PAP \text{ sistólica} + 2$ . A PSVD foi utilizada a fim de estimar a PAP sistólica. Sabe-se que a

PSVD é semelhante a pressão sistólica na artéria pulmonar, justificando a sua utilização na fórmula descrita (KOSKENVUO *et al.*, 2010). Para mensurar a RVP, utilizamos:  $RVP = (PAP - PDFVD) / DC$  (URBONIENE, 2010).



**Figura 14:** Introdução do cateter através da veia jugular, alcançando o ventrículo direito.  
(Retirado de CHEN *et al.*, 2013)



**Figura 15:** Pressão ventricular direita, obtida através do cateterismo da veia jugular.

#### **6.6.4. Avaliação da Hipertrofia Cardíaca**

Após a avaliação hemodinâmica, ainda anestesiados, os animais foram eutanasiados com o uso da guilhotina, após sobredose anestésica. A decapitação foi realizada em uma sala diferente de onde se encontravam os animais despertos e o responsável por este procedimento tinha experiência na sua realização.

Então, imediatamente o coração foi retirado da cavidade torácica e pesado integralmente, para realização do cálculo do Índice de Hipertrofia Cardíaca (IHC= massa do coração/massa corporal) (HU *et al.*, 2003). Posteriormente, os ventrículos foram separados para utilização dos índices de hipertrofia do VD: massa do VD/comprimento da tíbia (YIN *et al.*, 1982), massa do VD/massa corporal e massa do VD/massa do VE (FARAHMAND *et al.*, 2004). Ao término das pesagens, o VD foi rapidamente identificado e congelado em nitrogênio líquido para as avaliações bioquímicas.

#### **6.6.5. Avaliação da Congestão Pulmonar e Hepática**

Igualmente ao coração, o fígado e os pulmões foram retirados prontamente após eutanásia dos animais. Depois de serem pesados, foram acondicionados em uma estufa a uma temperatura de 65° C. Estes órgãos foram pesados diariamente, até que obtivéssemos um peso constante. O índice de congestão pulmonar e o índice de congestão hepática foram determinados pela relação peso úmido do órgão/peso seco do órgão (SINGAL *et al.*, 2000).

## 6.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

### 6.7.1. Homogeneização do Ventrículo Direito

Para a realização das análises de estresse oxidativo, o ventrículo direito foi homogeneizado durante 40 segundos (Ultra-Turrax; Bosch, Atibaia, SP, Brasil) com cloreto de potássio (KCl 1,15% - 2,5 mL/g de tecido para a análise de peróxido de hidrogênio ou 5 mL/g de tecido para as demais análises) e fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF) na concentração de 100 mmol/L em isopropanol (10µL/mL de KCl adicionado). O PMSF é um inibidor de proteases, evitando a degradação das enzimas cuja atividade foi avaliada. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 20 min a 3000 rpm em centrífuga refrigerada a 4°C (Modelo Mikro 220R; Hettich Zentrifugen) e os sobrenadantes armazenados em tubo tipo Eppendorff e congelados em freezer a -80° C, para realização das medidas determinadas (LLESUY *et al.*, 1985).

### 6.7.2. Quantificação de Proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry *et al.* (1951), que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1mg/mL. A leitura foi efetuada em um espectrofotômetro de placa (Anthos Zenyth, 200rt) a 625 nm. Os resultados foram expressos em mg de proteína/mL.

### **6.7.3. Avaliação das Enzimas Antioxidantes**

#### **6.7.3.1. Superóxido dismutase (SOD)**

A enzima superóxido dismutase catalisa a reação de dois ânions superóxido, com a consequente formação de peróxido de hidrogênio. Assim, a determinação da SOD se baseia na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol em meio básico. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. A atividade da SOD foi determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado. No ensaio, a oxidação máxima do pirogalol foi determinada, possibilitando assim calcular a percentagem de inibição causada pela SOD das amostras. A reação leva à formação de um produto de cor detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da enzima foi expressa em U SOD/mg de proteína (MARKLUND, 1985).

#### **6.7.3.2. Catalase (CAT)**

A catalase é uma hemoproteína que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio à água. Desta forma, o consumo do peróxido de hidrogênio pode ser utilizado como uma medida de atividade desta enzima. O ensaio consiste em mensurar a diminuição da absorbância no comprimento de onda de 240 nm. Devido à alta energia do comprimento de onda no qual as medidas são realizadas, utilizam-se cubetas de quartzo. Os resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteína (AEBI, 1985).

#### 6.7.3.3. Glutathione peroxidase (GPx)

A enzima glutathione peroxidase catalisa a reação de peróxidos com glutathione reduzida para formar glutathione oxidada e o produto da redução do peróxido. Dessa forma, a atividade desta enzima foi determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à esta enzima. A atividade foi medida pela absorbância em um comprimento de onda de 340 nm, e expressa por mmol/mg de proteína (FLOHÉ e GUNZLER, 1984).

#### 6.7.4. Concentração de Peróxido de Hidrogênio no Ventrículo Direito

O ensaio baseia-se na oxidação do vermelho de fenol mediada pela peroxidase de rabanete e pelo peróxido de hidrogênio, tendo como resultado um produto que absorve a 610 nm. Inicialmente, as amostras de VD foram homogeneizadas, conforme descrito no item 6.7.1. Para esta técnica, é importante que o sobrenadante seja preparado no mesmo dia que será realizada a análise. Em seguida, determinou-se uma curva padrão com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio de 10, 20 e 30 nmol/L. Após a adição do peróxido de hidrogênio na curva padrão e dos sobrenadantes dos homogeneizados nos poços da placa, o experimento deu andamento com a adição do tampão PRS (*phenol red solution*). Depois de adicionar o tampão PRS, a placa foi agitada à temperatura ambiente por 25 min. Em cada poço com amostra, foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH 1N). Em seguida, a leitura foi realizada e a concentração de peróxido

de hidrogênio no tecido cardíaco foi expressa em nmol/mg de proteína (PICK e KEISARI, 1980).

#### **6.7.5. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)**

A peroxidação lipídica foi avaliada através da mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), descrita por Ohkawa *et al.* (1979). Os homogeneizados foram misturados com 0,75 mL de TCA [m/v] a 20%, e em seguida realizou-se a centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos. O ácido tiobarbitúrico (0,67% [m/v]) foi adicionado a uma alíquota (0,5 mL) do sobrenadante e a mistura foi aquecida num banho com água fervente durante 15 min. A absorbância foi mensurada em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 535 nm. Os resultados foram expressos em nmol de TBARS / mg de proteína, utilizando o coeficiente de extinção do malondialdeído ( $156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

## **7. BIOSSEGURANÇA E DESCARTE DE ANIMAIS E RESÍDUOS**

Durante a execução da metodologia descrita, os pesquisadores e bolsistas envolvidos utilizaram equipamentos de proteção individual (EPIs) tais como: luvas, máscaras, jalecos e óculos de proteção, se necessário. Além destes cuidados básicos, o preparo de algumas soluções ocorreu dentro da capela de exaustão quando necessário. O descarte de resíduos não tóxicos ocorreu no sistema de esgoto comum e os demais resíduos foram encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para procedimento correto de eliminação. Os resíduos biológicos foram descartados no lixo de cor branca. As carcaças dos animais mortos foram recolhidas por uma empresa terceirizada, responsável pelo serviço de coleta de materiais biológicos.

## **8. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

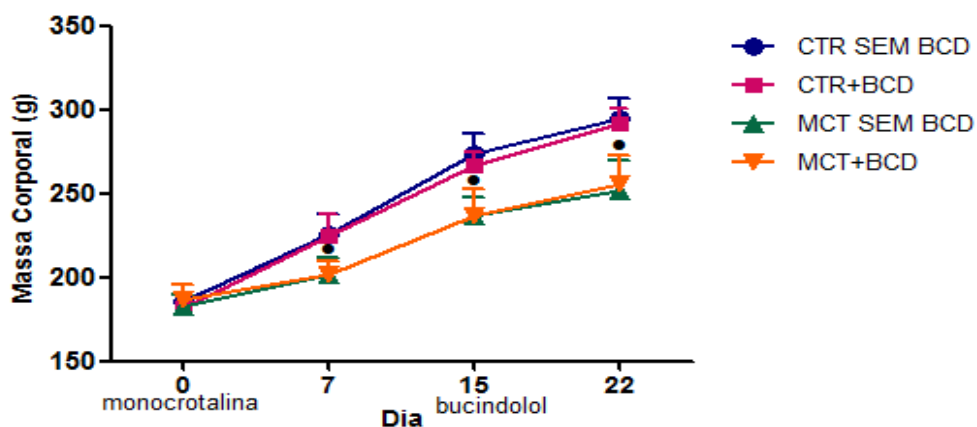
Os dados foram submetidos à avaliação da normalidade da amostra através do teste de Kolmogorov-Smirnov, tendo como resultado distribuição paramétrica. A análise temporal da massa corporal dos animais foi realizada através de ANOVA de medidas repetidas de duas vias, seguida pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Os demais resultados foram analisados pela ANOVA de duas vias, sendo considerado significativo um  $P < 0.05$ . O  $n$  obtido para cada análise é indicado nas figuras e tabelas de forma individual. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. O software Sigma Plot (12.0) foi utilizado como ferramenta para a análise dos dados.



## 9. RESULTADOS

### 9.1 AVALIAÇÃO DA MASSA CORPORAL

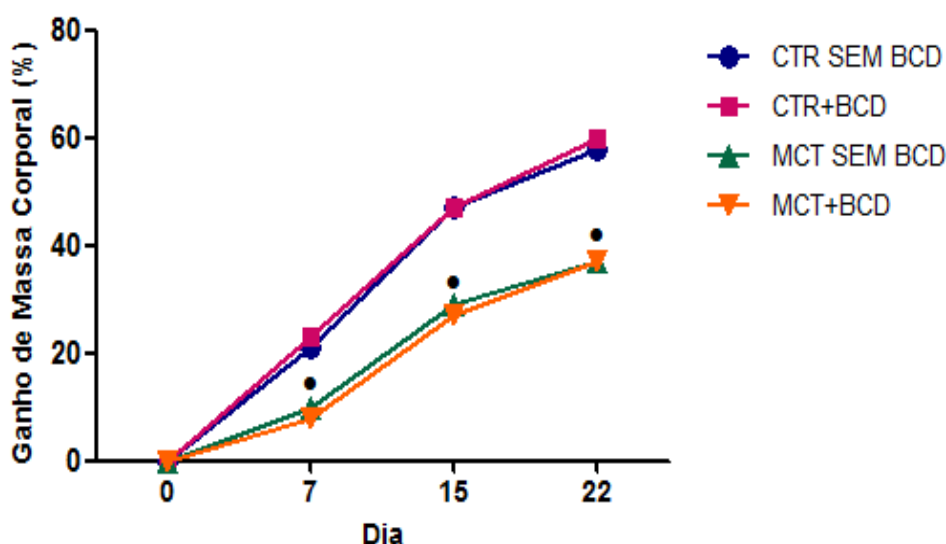
Os animais foram pesados semanalmente, com o objetivo de verificar o efeito da doença e do tratamento sobre o ganho de massa corporal. A figura 16 demonstra a massa corporal (expressa em gramas) dos diferentes grupos, durante o desenvolvimento do protocolo experimental. O dia 0 refere-se à massa corporal dos animais no dia da aplicação da monocrotalina ou solução salina. No 15º dia iniciou-se o tratamento com o beta-bloqueador bucindolol ou veículo, com duração de uma semana. No 7º dia, os grupos monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) mostraram uma massa corporal 11% menor que os animais que receberam solução salina (CTR SEM BCD e CTR+BCD). Já nos dias 15 e 22 mostraram uma diferença de 13% e 14%, respectivamente.



**Figura 16. Análise temporal da massa corporal de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina no dia 0 e no 15º iniciou-se o tratamento com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 7 a 10 animais por grupo. Para esta análise, foi utilizada ANOVA de medidas repetidas. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

● Grupos que receberam monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam monocrotalina (CTR SEM BCD e CTR+BCD), no 7º, 15º e 22º dia após aplicação da monocrotalina ou salina ( $P < 0,05$ ).

A figura 17 mostra a porcentagem de massa corporal ganha em relação à massa dos animais antes da indução da doença. Enquanto o grupo monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) aumentou 9%, 28% e 37% a sua massa aos 7, 15 e 22 dias, o grupo que recebeu solução salina (CTR SEM BCD e CTR+BCD) teve o acréscimo de 22%, 47% e 59% mensurado nestes dias. Mais do que isso, a diferença entre os animais que receberam monocrotalina para os que receberam salina que era de apenas 13% na primeira semana, passou para 22% no 22º dia. Sendo assim, evidenciamos que os animais que receberam a monocrotalina tiveram uma redução estatisticamente significativa no ganho de massa corporal, e que o tratamento com bucindolol não foi eficaz na redução deste acontecimento.



**Figura 17. Ganho de massa corporal dos animais, em porcentagem, ao longo do tempo.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina no dia 0 e no 15º dia iniciou-se o tratamento com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 7 a 10 animais por grupo. Para esta análise, foi utilizada ANOVA de medidas repetidas. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

• Grupos que receberam monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam monocrotalina (CTR SEM BCD e CTR+BCD), no 7º, 15º e 22º dia após aplicação da monocrotalina ou salina ( $P < 0,05$ ).

## 9.2 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA

### 9.2.1. Hipertrofia do Ventrículo Direito

A hipertrofia do VD foi mensurada através de diferentes índices: massa do coração/massa corporal (mg/mg), massa do VD/comprimento da tíbia (mg/mm), massa do VD/massa corporal (mg/mg) e massa do VD/massa do VE (g/g) (Tabela 5). Quando analisados, todos os índices apresentaram um aumento significativo nos grupos monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) quando comparados aos grupos que não receberam esta droga (CTR SEM BCD e CTR+BCD). Através da massa do coração/massa corporal, mensurou-se um aumento de 15% na massa do VD dos animais MCT SEM BCD em relação ao grupo CTR SEM BCD; e de 14% entre os animais MCT+BCD e os animais CTR+BCD. Quando relacionado apenas à massa do VD/massa corporal, o aumento encontrado nos grupos monocrotalina foi igualmente de 55%, quando comparados MCT SEM BCD com CTR SEM BCD e MCT+BCD com CTR+BCD. Por meio da massa VD/massa VE, 51% e 58% foi, respectivamente, a porcentagem da massa ventricular direita ganha nos grupos monocrotalina sem tratamento e monocrotalina bucindolol. Para confirmar a alteração observada por este índice, analisamos a massa do VD/comprimento da tíbia, visto que no modelo de HAP os animais apresentavam menor massa corporal, podendo ter influências nos resultados obtidos e descritos acima. Com relação a este índice, observamos o mesmo padrão de hipertrofia observado nos outros índices. Analisando os resultados, fica visível a hipertrofia do VD ocasionada pela HAP, e a não modulação desta pelo tratamento com o beta-bloqueador.

**Tabela 5.** Parâmetros morfométricos (índices de hipertrofia do ventrículo direito) de ratos Wistar machos. Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados obtidos após o final do protocolo experimental.

Parâmetros morfométricos	CTR SEM BCD	MCT SEM BCD	CTR+BCD	MCT+BCD
Massa Coração (g)	0,77±0,03	0,76±0,06	0,79±0,06	0,77±0,07
Coração/MC (mg/mg)	2,62±0,08	3,02±0,38* <sup>◇</sup>	2,72±0,23	2,99±0,19*
Massa VD (g)	0,19±0,04	0,25±0,06* <sup>◇</sup>	0,18±0,02	0,24±0,03**
VD/MC (mg/mg)	0,65±0,11	1,01±0,30* <sup>◇</sup>	0,60±0,08	0,93±0,12**
VD/Tibia (mg/mm)	5,68±1,10	7,49±1,79* <sup>◇</sup>	5,28±0,69	7,27±0,94**
VD/VE (g/g)	0,33±0,07	0,50±0,13* <sup>◇</sup>	0,29±0,05	0,46±0,10**

Valores expressos como média ± desvio padrão de 7 a 10 animais em cada grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol. VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo; MC: massa corporal.

● Grupos que receberam monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam monocrotalina (CTR SEM BCD e CTR+BCD) ( $P < 0,05$ ).

◇ Grupo MCT SEM BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

\* Grupo MCT+BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR+BCD ( $P < 0,05$ ).

### 9.2.2. Congestão Pulmonar e Congestão Hepática

O índice de congestão pulmonar foi obtido por meio da razão entre a massa do pulmão logo após a eutanásia do animal (peso úmido - g) e a menor massa obtida por pesagens consecutivas (peso seco - g). O mesmo índice também foi avaliado utilizando o peso úmido do pulmão/massa corporal (mg/mg) (Tabela 6). Quando analisamos o índice de congestão pulmonar utilizando o peso úmido/peso seco, houve um aumento significativo de 12% nos animais MCT SEM BCD em

relação ao CTR SEM BCD e de 14% quando analisados os grupos monocrotalina em relação aos que receberam solução salina. Apesar disto, ao observarmos o grupo MCT+BCD, não há diferença significativa quando comparado ao CTR+BCD. Em relação ao peso úmido do pulmão/massa corporal, o grupo MCT+BCD apresentou redução estatisticamente significativa de 22% na congestão pulmonar. Desta forma, demonstramos que os animais monocrotalina apresentaram congestão pulmonar, sinal clássico da HAP, e que esta foi atenuada pelo uso do beta-bloqueador bucindolol. O índice de congestão hepática foi calculado pela razão peso úmido/peso seco (Tabela 6). Os resultados encontrados não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais.

**Tabela 6.** Parâmetros morfométricos (índices de congestão pulmonar e hepática) de ratos Wistar machos. Os animais receberam injeção única de monocrotalina (80mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados obtidos após o final do protocolo experimental.

Parâmetros morfométricos	CTR SEM BCD	MCT SEM BCD	CTR+BCD	MCT+BCD
Massa Pulmão (g)	1,25±0,20	2,01±0,35* <sup>◊</sup>	1,34±0,26	1,62±0,12* <sup>†*</sup>
Pulmão - P. úmido/seco (g)	4,55±0,64	5,11±0,34* <sup>◊</sup>	4,90±0,36	4,95±0,17*
Pulmão - P. úmido/MC (mg)	4,22±0,59	8,02±1,67* <sup>◊</sup>	4,60±0,84	6,33±0,57* <sup>†*</sup>
Massa Fígado (g)	11,58±1,09	10,08±1,59* <sup>◊</sup>	10,97±0,95	10,42±1,63*
Fígado - P. úmido/seco (g)	3,40±0,11	3,46±0,12	3,55±0,20	3,47±0,12
Fígado - P. úmido/MC (mg)	3,92±0,24	3,98±0,41	3,76±0,31	4,05±0,41

Valores expressos como média ± desvio padrão de 7 a 10 animais em cada grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol. P.: peso; MC: massa corporal.

• Grupos que receberam monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam monocrotalina (CTR SEM BCD e CTR+BCD) ( $P < 0,05$ ).

◊ Grupo MCT SEM BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

† Grupo MCT+BCD diferiu significativamente em relação ao grupo MCT SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

\* Grupo MCT+BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR+BCD ( $P < 0,05$ ).

### 9.3 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA – VENTRÍCULO DIREITO

#### 9.3.1. Pressões Ventriculares e Derivadas de Pressão

Os resultados da tabela 7, demonstram um aumento significativo na pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD - mmHg) dos animais monocrotalina em comparação aos que receberam solução salina. O grupo MCT+BCD teve uma diminuição na PSVD de 37% em relação ao grupo MCT SEM BCD e um aumento de 39% em relação ao CTR+BCD. No entanto, os animais MCT SEM BCD diferiram 144% do grupo CTR SEM BCD.

Padrão semelhante foi encontrado na análise da pressão diastólica final do ventrículo direito (PDFVD - mmHg). O grupo MCT SEM BCD teve uma maior PDFVD (180%) quando comparado ao CTR SEM BCD. Contudo, o grupo MCT+BCD foi 60% inferior ao MCT SEM BCD. Ressalta-se que os animais com HAP tratados com bucindolol (MCT+BCD) não diferiram na PDFVD com relação ao grupo CTR+BCD.

As derivadas máxima ( $dP/dt_{\text{máx}}$  - mmHg/s) e mínima ( $dP/dt_{\text{mín}}$  - mmHg/s), mostram-se modificadas nos animais que receberam a monocrotalina. No grupo MCT SEM BCD, houve um aumento de 1,7 e 2 vezes, quando relacionados aos animais CTR SEM BCD, na  $dP/dt_{\text{máx}}$  e  $dP/dt_{\text{mín}}$ , respectivamente. No grupo MCT+BCD o aumento passou para 1,3 e 1,4 vezes em comparação ao grupo CTR+BCD, igualmente na  $dP/dt_{\text{máx}}$  e  $dP/dt_{\text{mín}}$ . Quando analisada a relação entre MCT SEM BCD e MCT+BCD, em ambas as derivadas o tratamento com bucindolol resultou na redução dos valores (21% para a derivada máxima e 26% para a derivada mínima). Sendo assim, confirmamos que os animais com HAP

apresentaram um grande aumento nas pressões do ventrículo direito e alterações na contratilidade e relaxamento do miocárdio. Porém, o beta-bloqueador bucindolol foi eficaz na redução da PSVD, PDFVD e derivadas de pressão.

**Tabela 7.** Parâmetros hemodinâmicos (cateterismo do ventrículo direito) de ratos Wistar machos. Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados obtidos após o final do protocolo experimental.

Parâmetros hemodinâmicos	CTR SEM BCD	MCT SEM BCD	CTR+BCD	MCT+BCD
PSVD (mmHg)	26±2	62±9 <sup>•◊</sup>	28±3 <sup>#</sup>	39±6 <sup>•#†*</sup>
PDFVD (mmHg)	2±1	7±3 <sup>◊</sup>	3±1	3±1 <sup>†</sup>
dP/dt <sub>max</sub> (mmHg/s)	1545±189	2671±465 <sup>•◊</sup>	1549±246	2135±244 <sup>•†*</sup>
dP/dt <sub>min</sub> (mmHg/s)	873±117	1738±297 <sup>•◊</sup>	907±142	1288±341 <sup>•†*</sup>

Valores expressos como média ± desvio padrão de 5 a 7 animais em cada grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol. PSVD: Pressão sistólica do ventrículo direito; PDFVD: Pressão diastólica final do ventrículo direito; dP/dt<sub>max</sub>: derivada pressão/tempo máxima; dP/dt<sub>min</sub>: derivada pressão/tempo mínima.

• Grupos que receberam monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam monocrotalina (CTR SEM BCD e CTR+BCD) ( $P < 0,05$ )

◊ Grupo MCT SEM BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR SEM BCD ( $P < 0,05$ )

\* Grupo MCT+BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR+BCD ( $P < 0,05$ )

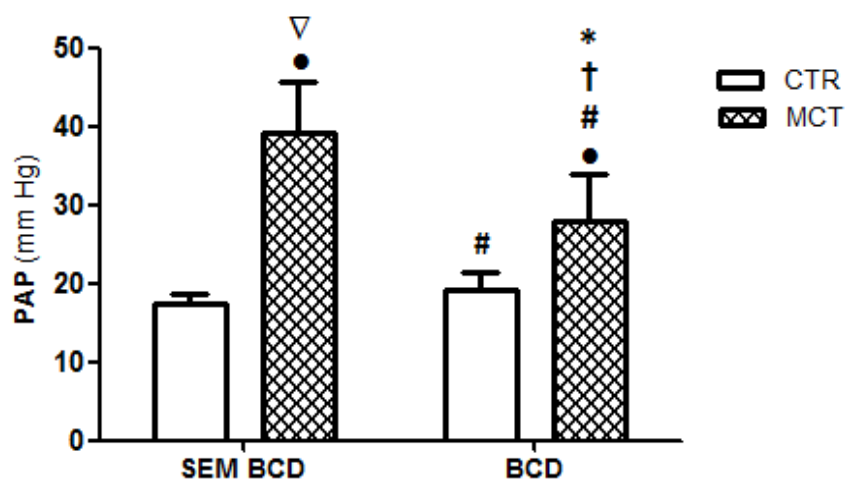
† Grupo MCT+BCD diferiu significativamente em relação ao grupo MCT SEM BCD ( $P < 0,05$ )

# Grupos que receberam bucindolol (CTR+BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam bucindolol (CTR SEM BCD e MCT SEM BCD) ( $P < 0,05$ )

### 9.3.2. Pressão da Artéria Pulmonar

Nos animais que receberam monocrotalina, a pressão da artéria pulmonar (PAP - mmHg) elevou-se 84%, em comparação aos animais que não receberam o

fármaco. Nos grupos que receberam bucindolol, a PAP reduziu 20% em relação aos grupos que não foram tratados com o beta-bloqueador. Ao compararmos o grupo MCT SEM BCD e MCT+BCD com seus controles (CTR SEM BCD e MCT SEM BCD), ambos apresentaram a PAP elevada, 126% e 46%, respectivamente. Contudo, o grupo MCT+BCD em relação ao grupo MCT SEM BCD, apresentou uma diminuição significativo de 30% no valor pressórico da artéria pulmonar (Figura 18). Estes resultados nos indicam que a HAP é determinada pelo aumento da PAP e que este é minimizado com a utilização do bucindolol.



**Figura 18. Análise da pressão na artéria pulmonar (PAP) de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 6 a 7 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

†Grupo MCT+BCD diferiu significativamente em relação ao grupo MCT SEM BCD ( $P < 0,05$ )

▽Grupo MCT SEM BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR SEM BCD ( $P < 0,05$ )

•Grupos que receberam monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam monocrotalina (CTR SEM BCD e CTR+BCD) ( $P < 0,05$ )

#Grupos que receberam bucindolol (CTR+BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam bucindolol (CTR SEM BCD e MCT SEM BCD) ( $P < 0,05$ )

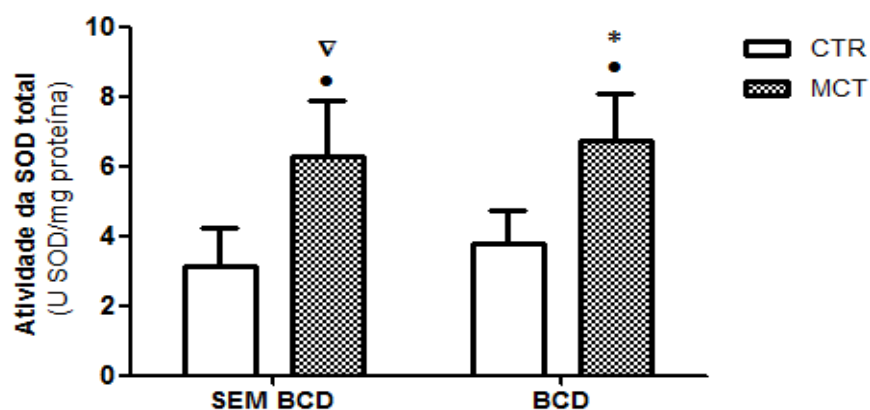
\*Grupo MCT+BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR+BCD ( $P < 0,05$ )



## 9.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

### 9.4.1. Enzimas Antioxidantes

Para manter o estado redox celular, as enzimas antioxidantes desempenham um importante papel reduzindo os oxidantes intracelulares. A enzima superóxido dismutase (SOD) é a responsável pela conversão do  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$ . A sua atividade (Figura 19) se apresentou 87% aumentada nos grupos monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) em relação aos grupos controle (CTR SEM BCD e CTR+BCD). O grupo MCT SEM BCD teve a atividade da SOD duas vezes maior que o grupo CTR SEM BCD, e o grupo MCT+BCD, 1,8 vezes em relação ao CTR+BCD.



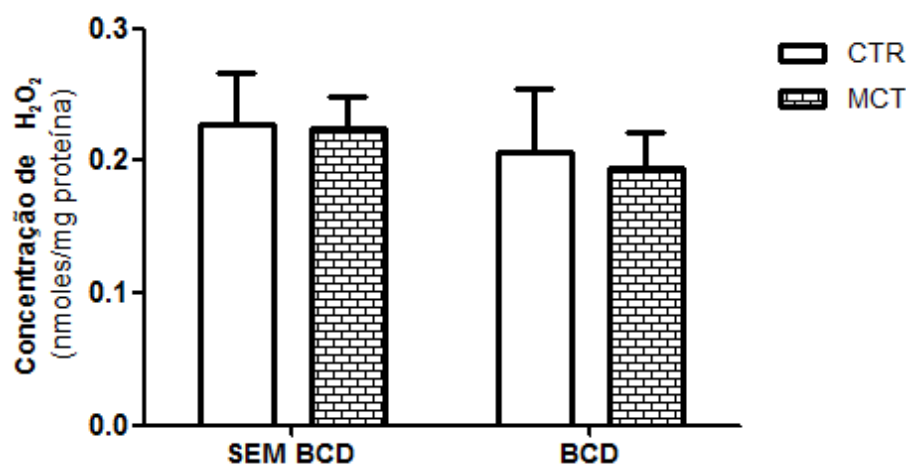
**Figura 19. Atividade da enzima antioxidante Superóxido Dismutase (SOD) em homogeneizado de ventrículo direito de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 6 a 8 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

• Grupos que receberam monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam monocrotalina (CTR SEM BCD e CTR+BCD) ( $P < 0,05$ ).

\* Grupo MCT+BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR+BCD ( $P < 0,05$ ).

∇ Grupo MCT SEM BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

No entanto, não se observou diferença significativa na concentração de  $H_2O_2$  (Figura 20) entre os grupos.

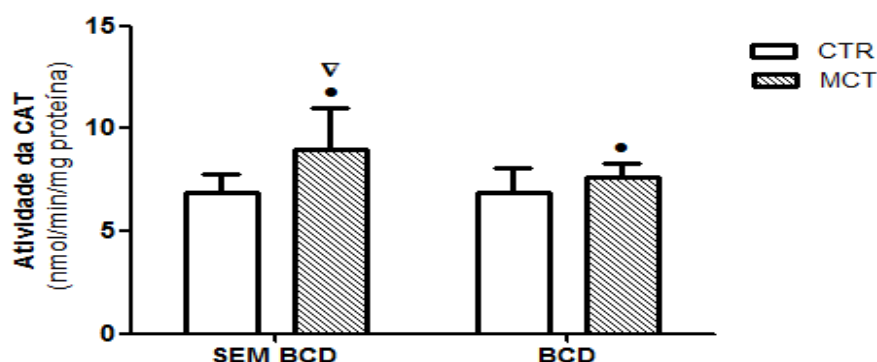


**Figura 20. Concentração de Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em homogeneizado de ventrículo direito de ratos wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 7 a 8 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol (2mg/Kg/dia i.p. - 7 dias); MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina (60mg/Kg i.p. - dose única) e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

Não foi observado diferença significativa entre os grupos.

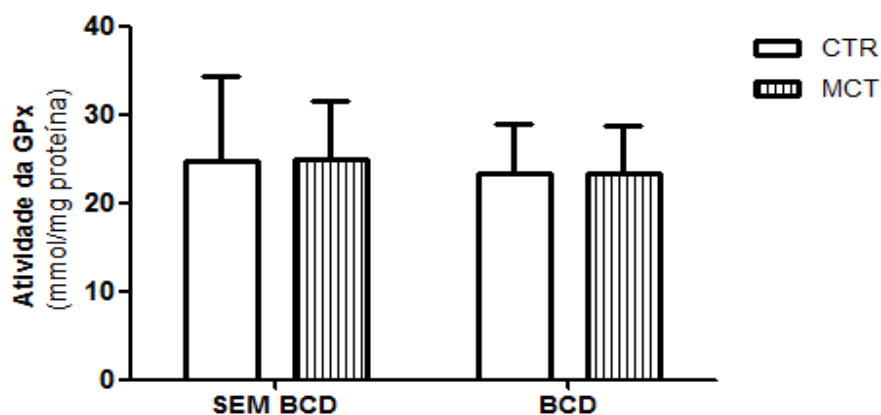
A enzima catalase (CAT), que é responsável pela redução de  $H_2O_2$  à água, mostrou uma atividade aumentada (20%) (Figura 21) em animais monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) quando comparado com (CTR SEM BCD e CTR+BCD). Quando analisamos os animais monocrotalina sem tratamento, os resultados indicaram 31% a mais de atividade da CAT em relação ao seu controle. A glutathiona peroxidase (GPx) (Figura 22), responsável pela detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos, reduzindo  $H_2O_2$  à água, não apresentou diferença significativa entre os animais. Os resultados sugerem que as EROS

estão fortemente associados ao modelo de HAP, porém, o bucindolol não atuou para a redução deste estresse oxidativo.



**Figura 21. Atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) em homogeneizado de ventrículo direito de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 6 a 7 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

● Grupos que receberam monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam monocrotalina (CTR SEM BCD e CTR+BCD) ( $P < 0,05$ ).  
 ▽ Grupo MCT SEM BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

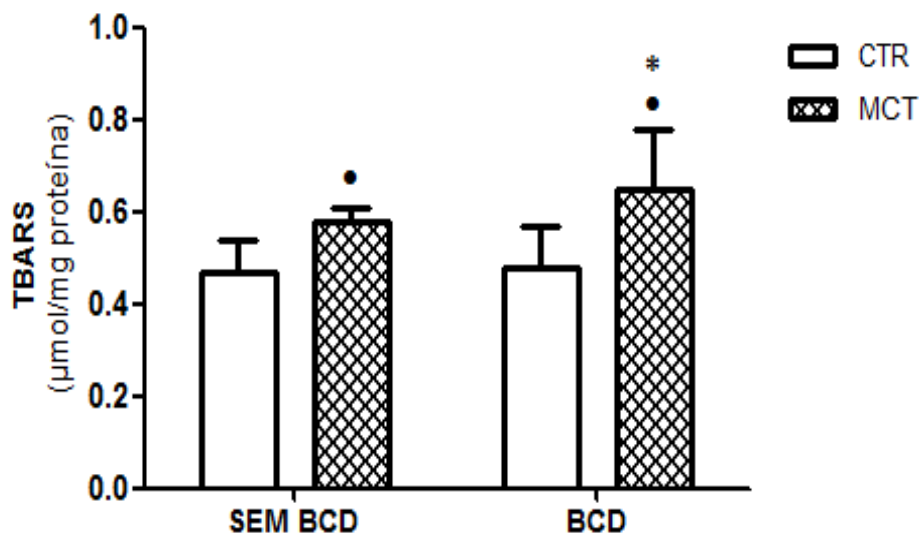


**Figura 22. Atividade da enzima antioxidante Glutathione Peroxidase (GPx) em homogeneizado de ventrículo direito de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 7 a 10 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol (2mg/Kg/dia i.p. - 7 dias); MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina (60mg/Kg i.p. - dose única) e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

Não foi observada diferença significativa entre os grupos.

#### 9.4.2. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS)

Mensurado pela técnica (TBA-RS), a lipoperoxidação demonstrou aumento nos animais monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) em relação aos animais controle (CTR SEM BCD e CTR+BCD). Sendo assim, os animais com HAP apresentaram um maior dano lipídico. Neste regime de tratamento, não foram observadas diferenças na lipoperoxidação em relação ao uso do bucindolol.



**Figura 23. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em homogeneizado de ventrículo direito de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 5 a 7 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

- Grupos que receberam monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam monocrotalina (CTR SEM BCD e CTR+BCD) ( $P < 0,05$ ).
- \* Grupo MCT+BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR+BCD ( $P < 0,05$ ).

## 9.5 ANÁLISES ECOCARDIOGRÁFICAS

### 9.5.1. Função Sistólica do Ventrículo Direito

Os dados relacionados à função sistólica do VD estão apresentados na tabela 8. Os animais que receberam o beta-bloqueador apresentaram o diâmetro diastólico do VD (DdVD - cm) menor (18%), quando comparado aos animais que receberam o veículo (CTR SEM BCD e MCT SEM BCD). Quando observado o diâmetro sistólico deste ventrículo (DsVD - cm), os animais monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) diferiram dos animais que receberam salina (CTR SEM BCD e CTR+BCD), tendo um diâmetro 21% maior. Já, ao compararmos os grupos bucindolol (MCT+BCD e CTR+BCD) aos não tratados, o diâmetro na sístole apresentou-se 33% menor. O grupo MCT SEM BCD apresentou diferença significativa quando relacionado ao grupo CTR SEM BCD, com 26% de aumento no diâmetro sistólico. E quando comparado os animais MCT+BCD com os animais MCT SEM BCD, houve redução de 28% no diâmetro diastólico do ventrículo direito nos animais com tratamento. Além disso, vale ressaltar que o diâmetro não foi diferente estatisticamente entre o grupo MCT+BCD e o CTR+BCD.

Quando analisamos a área do VD na diástole (cm<sup>2</sup>), diferenças significativas não foram encontradas. Porém, na análise da área do VD na sístole, evidenciou-se a redução (48%) apresentada pelos animais que receberam o tratamento com bucindolol (MCT+BCD e CTR+BCD). O grupo MCT+BCD apresentou uma área sistólica 40% inferior ao grupo MCT SEM BCD.

Com relação à mudança de área fracional (MAF - %), os animais que receberam monocrotalina (MCT+BCD e MCT SEM BCD) apresentaram uma

menor variação da área. Contrariamente, os animais que receberam o beta-bloqueador (MCT+BCD e CTR+BCD), apresentaram uma maior MAF (29%). O grupo MCT SEM BCD reduziu 35% do resultado do grupo CTR SEM BCD, e 32% do valor encontrado para o grupo MCT+BCD. Novamente, como no parâmetro anterior, o grupo monocrotalina que recebeu o beta-bloqueador não foi diferente do CTR+BCD.

O TAPSE (expresso em cm), que avalia o componente longitudinal da contração ventricular direita, nos grupos monocrotalina (MCT+BCD e MCT SEM BCD) se mostrou inferior aos grupos que receberam salina. Inversamente, os animais que receberam o tratamento com bucindolol, apresentaram resultados superiores aos animais que não receberam o tratamento. O grupo MCT SEM BCD quando comparado ao grupo CTR SEM BCD, apresentou um TAPSE 34% inferior. Já o grupo MCT+BCD, apresentou um TAPSE 29% maior que o grupo MCT SEM BCD.

A fração de encurtamento (FEC - %) do VD, igualmente à análise anterior, demonstrou-se inferior nos grupos que receberam monocrotalina. Contrariamente, os animais tratados com bucindolol, apresentaram resultados superiores aos animais que não receberam o tratamento. O grupo MCT SEM BCD quando comparado ao grupo CTR SEM BCD, apresentou um FEC 40% inferior. Já o grupo MCT+BCD, apresentou um FEC 57% maior que o grupo MCT SEM BCD.

Ao analisarmos o volume sistólico (VS - ml), os grupos monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) apresentaram valores 27% menores que os grupos controle (CTR SEM BCD e CTR+BCD). O VS dos animais MCT SEM BCD diferiu significativamente dos animais CTR SEM BCD, porém, o grupo MCT+BCD não foi

diferente estatisticamente do grupo CTR+BCD. Quando comparados MCT SEM BCD e MCT+BCD, os animais tratados apresentaram um VS 28% maior. O débito cardíaco (DC - mL/min) também foi encontrado aumentado (45%) nos grupos controle (CTR SEM BCD e CTR+BCD) em relação aos grupos monocrotalina (MCT+BCD e MCT SEM BCD). Apesar de não encontrarmos diferença estatisticamente significativa entre os grupos MCT SEM BCD e MCT+BCD, os animais monocrotalina tratados apresentaram um DC 20% superior em relação ao outro grupo. Imagens representativas (DdVD, DsVD e TAPSE) obtidas através da ecocardiografia estão apresentadas nas páginas 87 e 88.

**Tabela 8.** Parâmetros ecocardiográficos (**função sistólica do ventrículo direito**) de ratos Wistar machos. Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados obtidos no final do protocolo experimental.

Parâmetros ecocardiográficos	CTR SEM BCD	MCT SEM BCD	CTR+BCD	MCT+BCD
DdVD (cm)	0,312±0,042	0,333±0,100	0,266±0,030 <sup>#</sup>	0,273±0,036 <sup>#</sup>
DsVD (cm)	0,214±0,028	0,270±0,080 <sup>◊</sup>	0,170±0,017 <sup>#</sup>	0,195±0,014 <sup>•#†</sup>
Área diástole (cm <sup>2</sup> )	0,158±0,028	0,194±0,124	0,147±0,029	0,147±0,035
Área sístole (cm <sup>2</sup> )	0,089±0,021	0,140±0,093	0,070±0,012 <sup>#</sup>	0,085±0,02 <sup>#†</sup>
MAF VD (%)	43,62±7,99	28,25±5,84 <sup>◊</sup>	51,59±8,34 <sup>#</sup>	41,28±9,75 <sup>•#†*</sup>
TAPSE (mm)	0,247±0,016	0,164±0,022 <sup>◊</sup>	0,250±0,025 <sup>#</sup>	0,211±0,018 <sup>•#†*</sup>
FEC VD (%)	31,04±5,66	18,66±7,15 <sup>◊</sup>	35,62±7,46 <sup>#</sup>	29,23±4,41 <sup>•#†</sup>
VS (ml)	0,34±0,02	0,21±0,06 <sup>◊</sup>	0,32±0,07	0,27±0,04 <sup>†</sup>
DC (ml/min)	89±5	55±13 <sup>◊</sup>	86±13	66±13 <sup>•*</sup>

Valores expressos como média ± desvio padrão de 7 a 9 animais em cada grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. DdVD: diâmetro diastólico do ventrículo direito; DsVD: diâmetro sistólico do ventrículo direito; VD: ventrículo direito; FAC: mudança de área fracional; TAPSE: excursão sistólica do plano anular tricúspide; FEC: fração de encurtamento; VS: volume sistólico e DC: débito cardíaco.

• Grupos que receberam monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam monocrotalina (CTR SEM BCD e CTR+BCD) ( $P < 0,05$ ).

◊ Grupo MCT SEM BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

\* Grupo MCT+BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR+BCD ( $P < 0,05$ ).

† Grupo MCT+BCD diferiu significativamente em relação ao grupo MCT SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

# Grupos que receberam bucindolol (CTR+BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam bucindolol (CTR SEM BCD e MCT SEM BCD) ( $P < 0,05$ ).



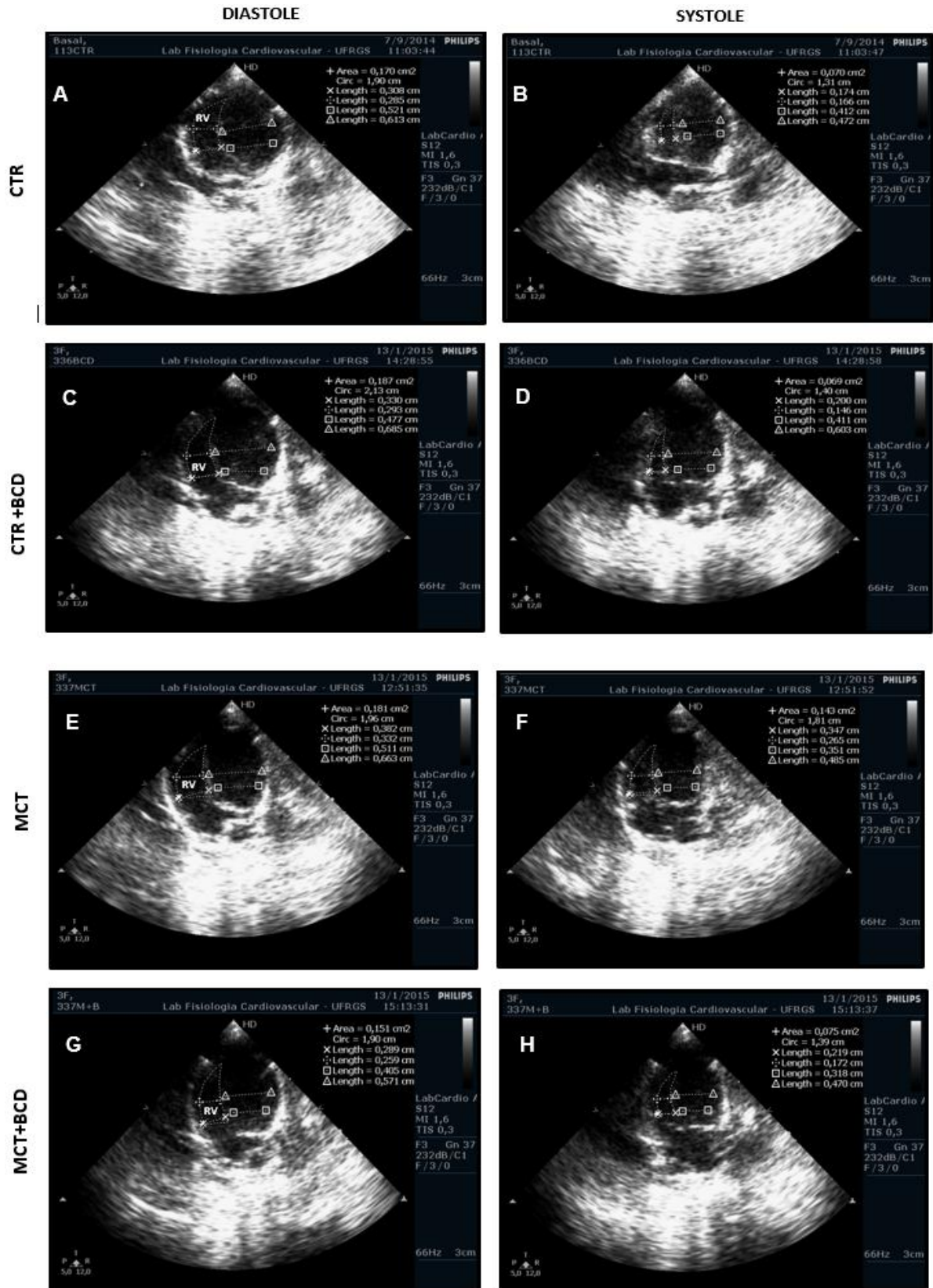


Figura 24: Imagem representativa do diâmetro e área sistólica e diastólica do VD.



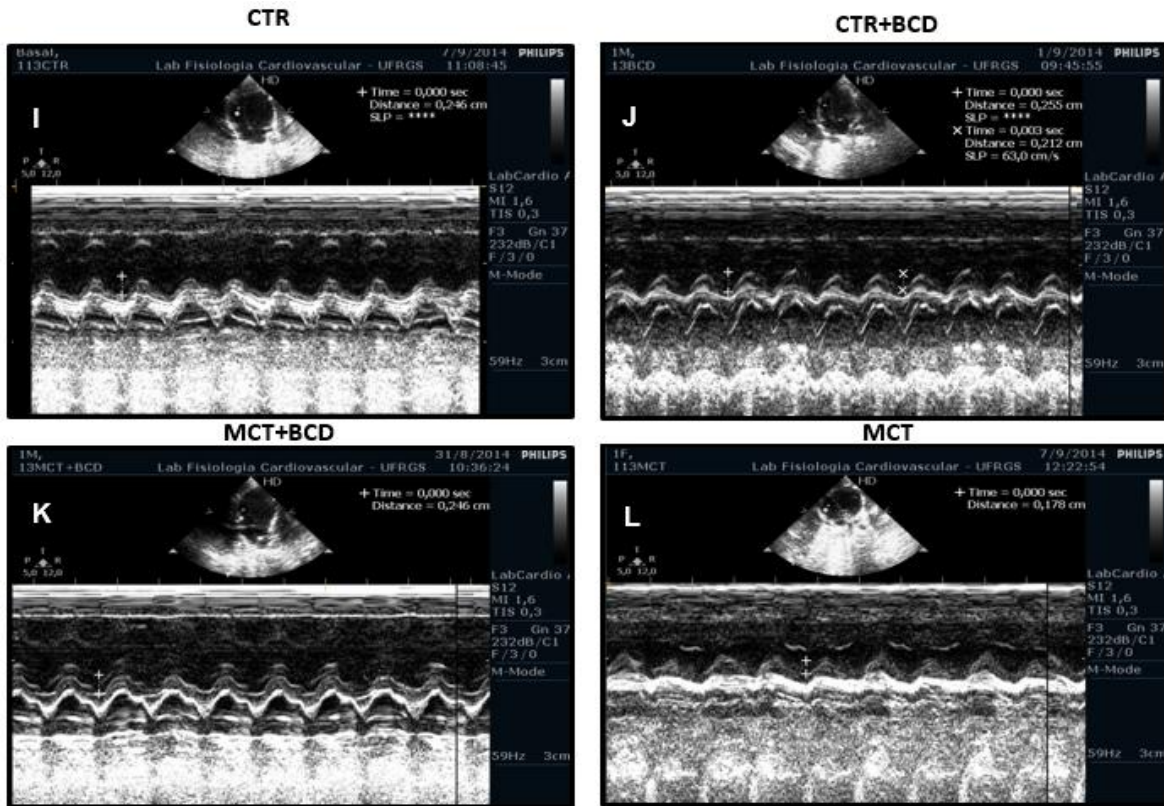


Figura 25: Imagem representativa do TAPSE.

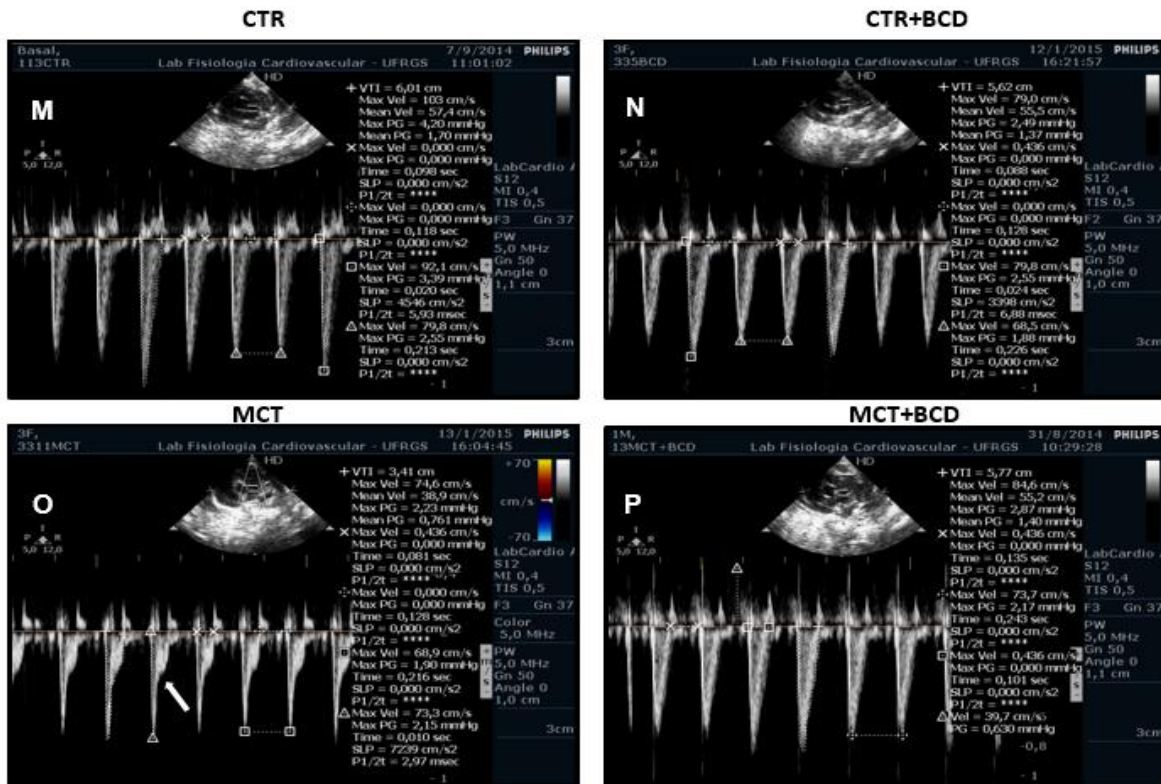


Figura 26: Imagem representativa do fluxo pela artéria pulmonar (TAC/TEJ).

### 9.5.2. Função Diastólica do Ventrículo Direito

A relação pico E/ pico A (cm/s / cm/s) (Tabela 9) é indicativo de função diastólica do VD. Esse parâmetro foi significativamente inferior (26%) nos animais monocrotalina em relação aos animais que receberam salina (CTR SEM BCD e CTR+BCD). O grupo MCT SEM BCD apresentou uma diminuição de 27% na relação E/A, quando comparado ao grupo CTR SEM BCD. O mesmo ocorreu com o grupo MCT+BCD, que teve uma redução de 24% em relação ao grupo CTR+BCD.

**Tabela 9.** Parâmetros ecocardiográficos através do fluxo pela válvula tricúspide (**função diastólica do ventrículo direito**) de ratos Wistar machos. Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados obtidos após o final do protocolo experimental.

Parâmetros ecocardiográficos	CTR SEM BCD	MCT SEM BCD	CTR+BCD	MCT+BCD
Pico E / Pico A	0,89±0,07	0,65±0,06 <sup>♦</sup>	0,95±0,18	0,72±0,08 <sup>•*</sup>

Valores expressos como média ± desvio padrão de 6 a 7 animais em cada grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

• Grupos que receberam monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam monocrotalina (CTR SEM BCD e CTR+BCD) ( $P < 0,05$ ).

♦ Grupo MCT SEM BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

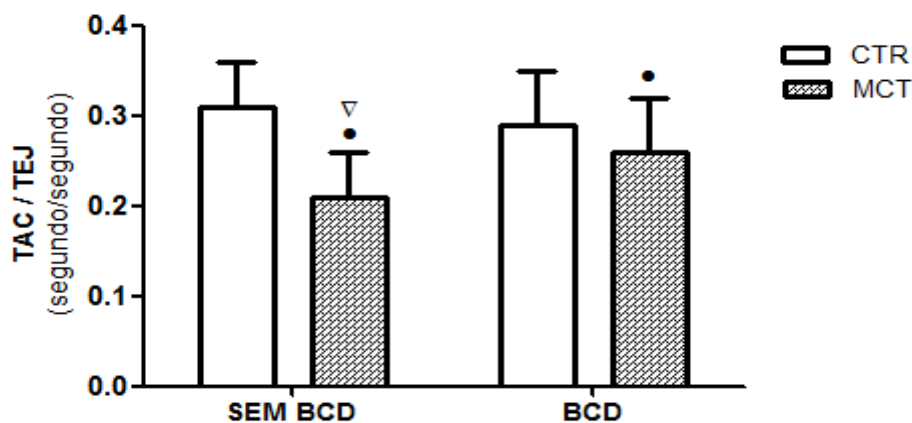
\* Grupo MCT+BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR+BCD ( $P < 0,05$ ).

### 9.5.3. Resistência Vascular Pulmonar

A relação de tempo de aceleração / tempo de ejeção (TAC/TEJ – segundos /segundos) foi menor em animais tratados com monocrotalina (MCT SEM BCD e

MCT+BCD) em comparação com animais tratados com solução salina (CTR SEM BCD e CTR+BCD). Sabe-se, que quanto mais baixa a relação TAC/TEJ, mais elevada é a RVP. Assim, o bucindolol não foi capaz de reduzir a sobrecarga de pressão (Figura 27).

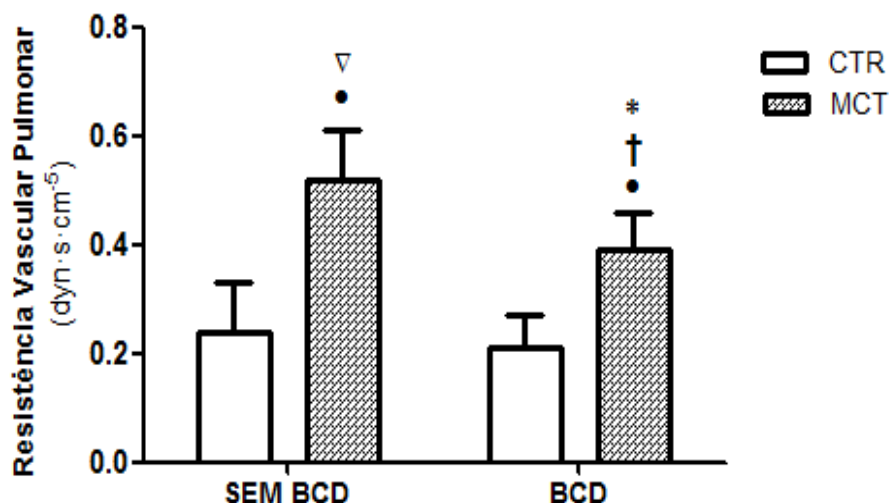
No entanto, quando realizada a análise da RVP (Figura 28) através da fórmula que leva em conta valores obtidos pelo cateterismo do ventrículo direito e DC, podemos observar diferentes respostas. Os animais monocrotalina, quando comparados aos animais salina (CTR SEM BCD e CTR+BCD), tiveram um aumento significativo de na RVP. No entanto, o grupo MCT+BCD teve uma redução significativa de 25% na resistência pulmonar, ao seu comparado ao grupo MCT SEM BCD. Desta forma, o beta-bloqueador bucindolol foi responsável pela atenuação da RVP elevada nos animais com HAP (Figura 31).



**Figura 27. Relação do tempo de aceleração / tempo de ejeção (TAC/TEJ) do fluxo de sangue pela artéria pulmonar de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 6 a 7 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

$\nabla$ Grupo MCT SEM BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

• Grupos que receberam monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam monocrotalina (CTR SEM BCD e CTR+BCD) ( $P < 0,05$ ).



**Figura 28. Análise da Resistência Vascular Pulmonar (RVP) de ratos wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 6 a 7 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

†Grupo MCT+BCD diferiu significativamente em relação ao grupo MCT SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

▽Grupo MCT SEM BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

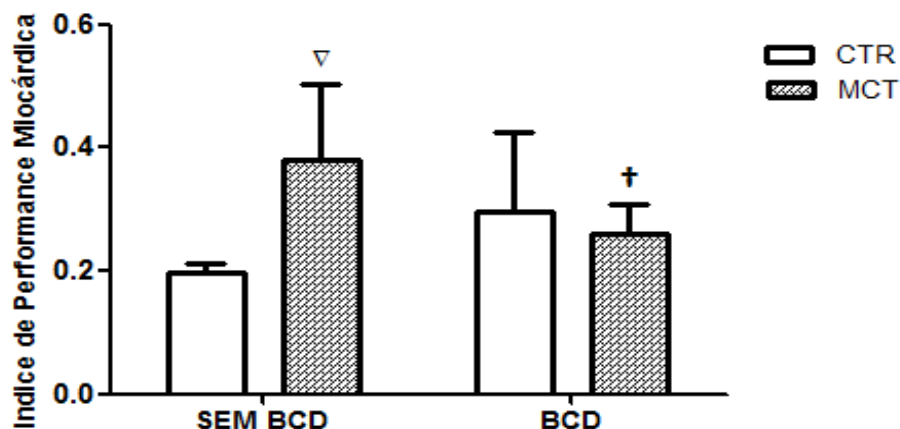
•Grupos que receberam monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam monocrotalina (CTR SEM BCD e CTR+BCD) ( $P < 0,05$ ).

\*Grupo MCT+BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR+BCD ( $P < 0,05$ ).

#### 9.5.4. Índice de Performance Miocárdica

O índice de performance miocárdica (IPM), que incorpora no cálculo variáveis sistólicas e diastólicas, apresentou importante correlação com a morbidade e prognóstico nos quadros de HAP. Sabe-se que quanto mais alto o valor do IPM, maior é a disfunção miocárdica. O grupo MCT SEM BCD foi diferente estatisticamente do grupo CTR SEM BCD, com um aumento de 2 vezes no IPM. Já no grupo MCT+BCD, não foram encontradas diferenças em relação ao

CTR+BCD. Quando comparamos o grupo MCT+BCD ao grupo MCT SEM BCD, houve um aumento de 1,5 vezes no IPM nos animais que não receberam o tratamento. Sendo assim, sugere-se que o IPM que se mostrou alterado na HAP sem tratamento, tenha sido associado a um melhor desempenho ventricular nos animais com HAP tratados com bucindolol.



**Figura 29. Análise do Índice de Performance Miocárdica (IPM) de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 6 a 7 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

†Grupo MCT+BCD diferiu significativamente em relação ao grupo MCT SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

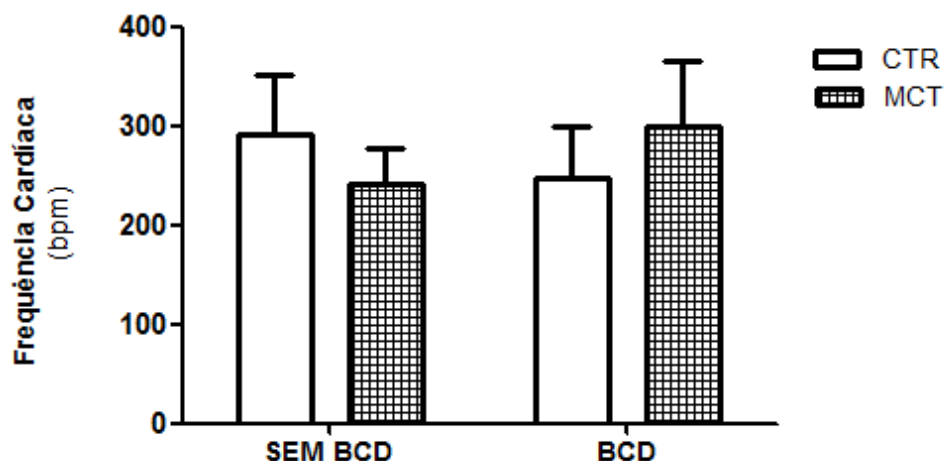
∇Grupo MCT SEM BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

## 9.6 ANÁLISE ESPECTRAL – SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO

### 9.6.1. Frequência Cardíaca

Com relação à frequência cardíaca (FC), expressa em batimentos por minuto (bpm), nenhuma alteração estatisticamente significativa foi observada nos diferentes grupos experimentais (Figura 30).



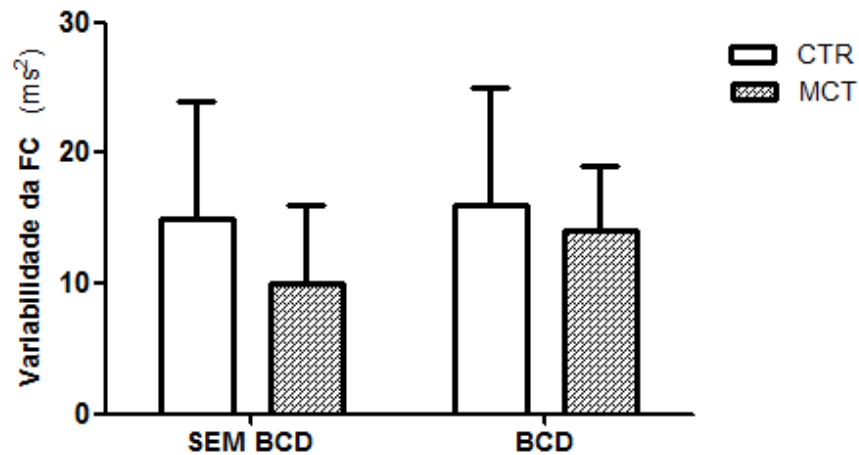


**Figura 30. Análise espectral no domínio da frequência. Frequência cardíaca de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 4 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

Não foi observada diferença significativa entre os grupos.

### 9.6.2. Variabilidade da Frequência Cardíaca

Quando analisamos a variabilidade da frequência cardíaca (VFC – ms<sup>2</sup>) e sua relação com a HAP e o tratamento, não verificamos diferença significativa nesta janela temporal (Figura 31).



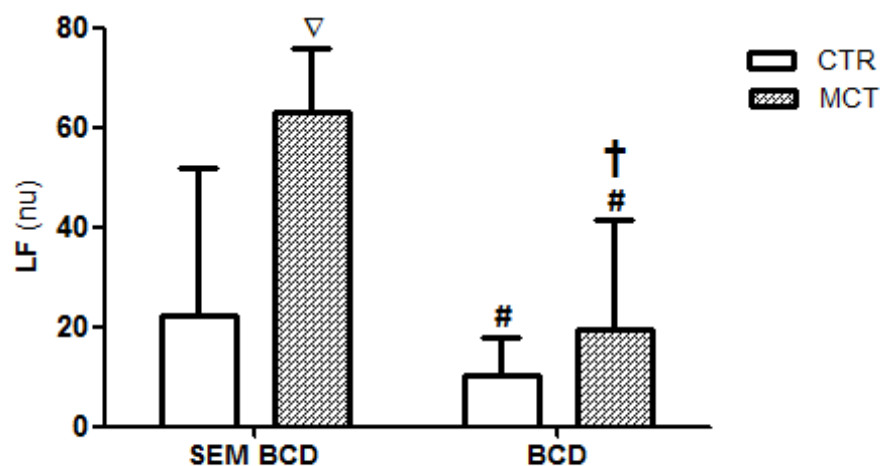
**Figura 31. Análise espectral no domínio da frequência. Variabilidade da frequência cardíaca de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 4 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol. FC: frequência cardíaca.

Não foi observado diferença significativa entre os grupos.

### 9.6.3. Sistema Nervoso Simpático no Controle Cardíaco

A faixa de baixa frequência normalizada (LFnu), que indica a porcentagem de atividade autonômica exercida pelo sistema nervoso simpático sobre o coração, apresentou uma diminuição de 66% nos grupos tratados com o beta-bloqueador bucindolol (MCT+BCD e CTR+BCD) em relação aos não tratados (MCT SEM BCD e CTR SEM BCD). Quando comparamos o grupo MCT SEM BCD com CTR SEM BCD, houve um aumento de 181% na atividade simpática. Ao observarmos os animais MCT+BCD, o resultado encontrado é redução de 70% na estimulação simpática cardíaca, em relação aos animais MCT SEM BCD (Figura

32). Desta forma, entendemos que os animais com HAP apresentaram uma hiperatividade simpática e que esta, através do bloqueio simpático com bucindolol, pode ser atenuada.



**Figura 32. Análise espectral no domínio da frequência. Faixa de baixa frequência normalizada (LFnu) de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 4 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

†Grupo MCT+BCD diferiu significativamente em relação ao grupo MCT SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

∇Grupo MCT SEM BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

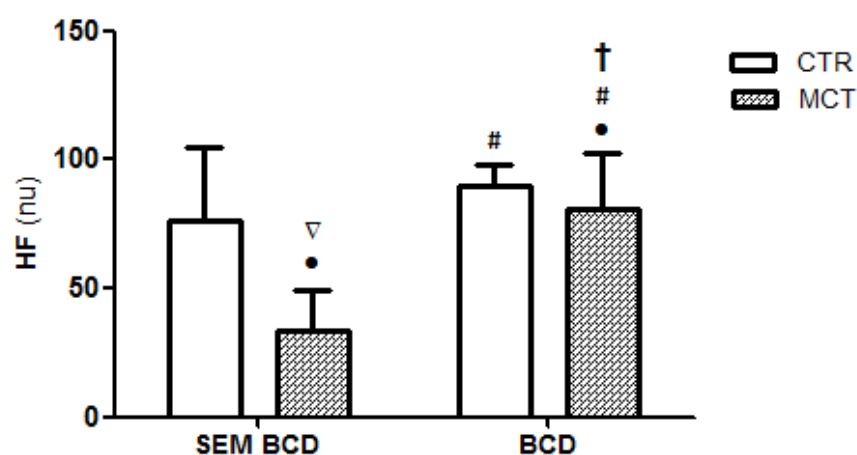
#Grupos que receberam bucindolol (CTR+BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam bucindolol (CTR SEM BCD e MCT SEM BCD) ( $P < 0,05$ ).

#### 9.6.4. Sistema Nervoso Parassimpático no Controle Cardíaco

A faixa de alta frequência normalizada (HFnu), que indica a porcentagem de atividade autonômica exercida pelo sistema nervoso parassimpático sobre o músculo cardíaco, apresentou um incremento de 56% nos animais tratados com o



bucindolol (MCT+BCD e CTR+BCD) em comparação aos não tratados (MCT SEM BCD e CTR SEM BCD). Ao compararmos o grupo MCT SEM BCD ao CTR SEM BCD, encontramos uma diminuição de 57% na atividade parassimpática dos animais doentes. Quando observamos a resposta do grupo MCT+BCD em relação ao grupo MCT SEM BCD, o aumento é de 142%. Além disso, MCT+BCD e CTR+BCD não diferiram significativamente (Figura 33). Portanto, cabe afirmar, que os animais com HAP correlacionam-se com uma hipoatividade parassimpática, e que o tratamento com o beta-bloqueador bucindolol manteve um nível fisiológico de ativação.



**Figura 33. Análise espectral no domínio da frequência. Faixa de alta frequência normalizada (HFnu) de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 4 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

†Grupo MCT+BCD diferiu significativamente em relação ao grupo MCT SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

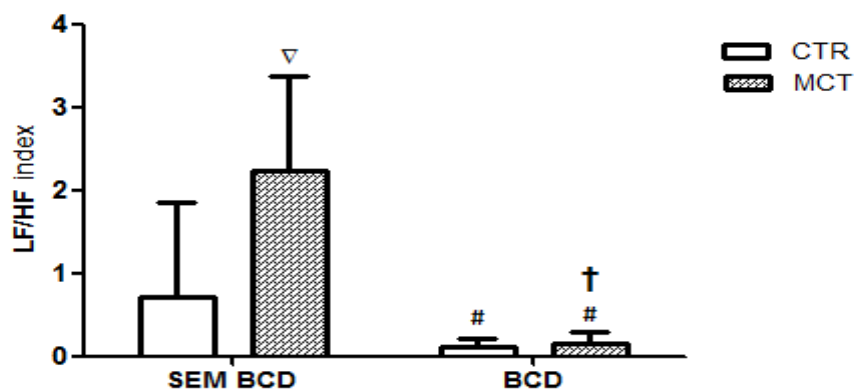
∇Grupo MCT SEM BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

•Grupos que receberam monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam monocrotalina (CTR SEM BCD e CTR+BCD) ( $P < 0,05$ ).

#Grupos que receberam bucindolol (CTR+BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam bucindolol (CTR SEM BCD e MCT SEM BCD) ( $P < 0,05$ ).

### 9.6.5. Balanço Simpato-Vagal no Controle Cardíaco

A relação LF/HF reflete o balanço entre os componentes simpático e parassimpático do sistema nervoso autônomo, caracterizando o balanço simpato-vagal sobre o coração. Os animais que foram tratados com bucindolol (CTR+BCD e MCT+BCD), apresentaram uma redução de 91% em relação aos animais tratados com veículo. Ao compararmos o grupo MCT SEM BCD com o grupo CTR SEM BCD, houve um aumento de 211% no balanço simpato-vagal dos animais com HAP. Já, a diminuição nos animais MCT+BCD para os animais MCT SEM BCD foi de 93% (Figura 34). Estes resultados indicam um predomínio da atividade simpática nos animais com HAP, e a capacidade do bucindolol de atuar na proporção simpática e parassimpática do controle autonômico.



**Figura 34. Análise espectral no domínio da frequência. Balanço simpato-vagal (LF/HF) de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 4 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

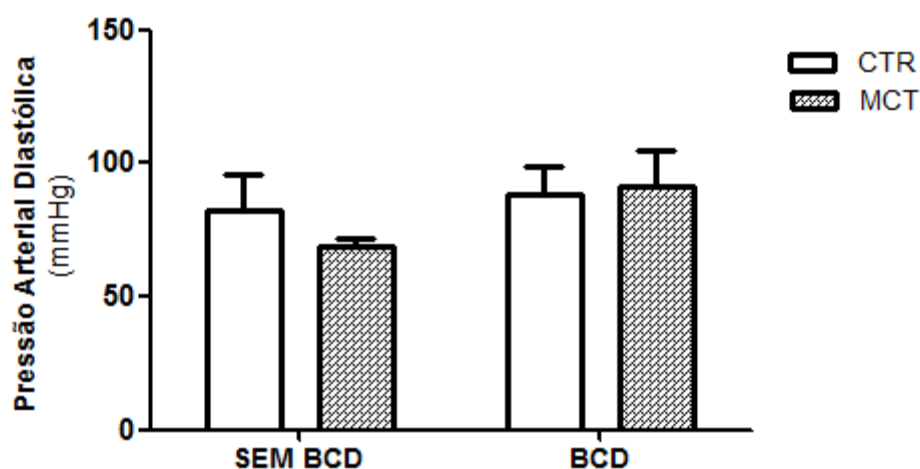
†Grupo MCT+BCD diferiu significativamente em relação ao grupo MCT SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

∇Grupo MCT SEM BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

#Grupos que receberam bucindolol (CTR+BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam bucindolol (CTR SEM BCD e MCT SEM BCD) ( $P < 0,05$ ).

### 9.6.6. Pressão Arterial

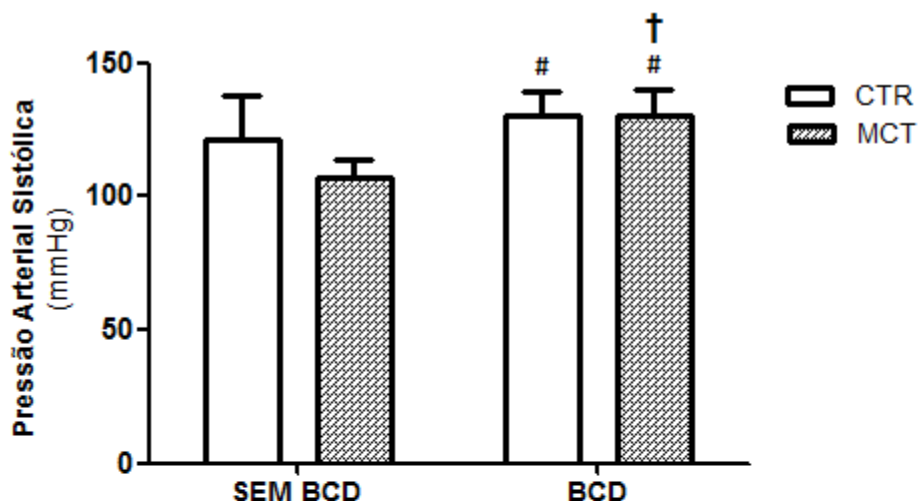
Tanto a HAP quanto o tratamento com o beta-bloqueador bucindolol, não resultaram em diferenças significativas no nível pressórico diastólico (mmHg) (Figura 35).



**Figura 35. Pressão arterial diastólica de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 4 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

Não foi observada diferença significativa entre os grupos.

Porém, 14% foi o aumento observado na pressão arterial sistólica (PAS - mmHg) dos animais que receberam o beta-bloqueador, em comparação aos que não receberam. O grupo MCT+BCD em relação ao grupo MCT SEM BCD, apresentou um aumento de 21% no nível pressórico sistólico (Figura 36).



**Figura 36. Pressão arterial sistólica de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 4 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

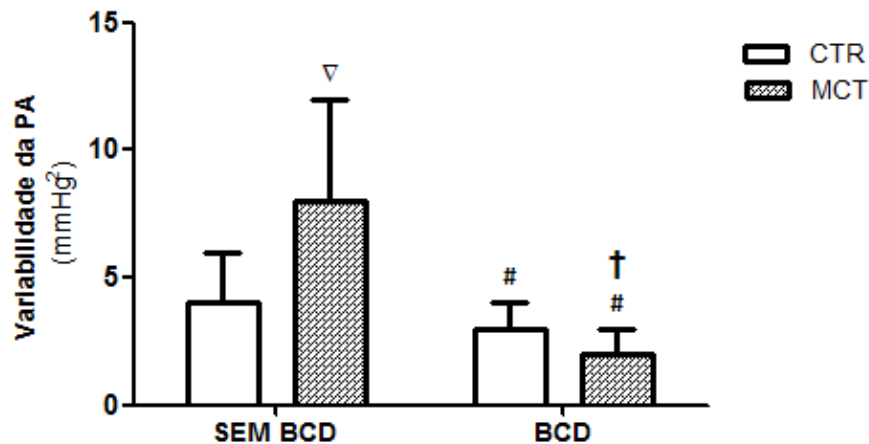
#Grupos que receberam bucindolol (CTR+BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam bucindolol (CTR SEM BCD e MCT SEM BCD) ( $P < 0,05$ ).

†Grupo MCT+BCD diferiu significativamente em relação ao grupo MCT SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

### 9.6.7. Variabilidade da Pressão Arterial

Quando analisamos a variabilidade da pressão arterial (VPA – mmHg<sup>2</sup>), fica clara a redução (50%) apresentada pelos animais que receberam o tratamento com bucindolol (MCT+BCD e CTR+BCD), em relação aos que não receberam. Assim, o grupo MCT+BCD apresentou uma diminuição de 75% na VPA, quando comparado ao grupo MCT SEM BCD. Diferentemente do grupo MCT+BCD que não diferiu do seu grupo controle (CTR+BCD), no grupo MCT SEM BCD encontrou-se aumento significativo de 100% em relação ao grupo CTR SEM BCD

(Figura 37). Portanto, cabe afirmar, que os animais com HAP apresentam uma maior VPA, e que esta pode ser modulada pelo bucindolol.



**Figura 37. Variabilidade da pressão arterial de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 4 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

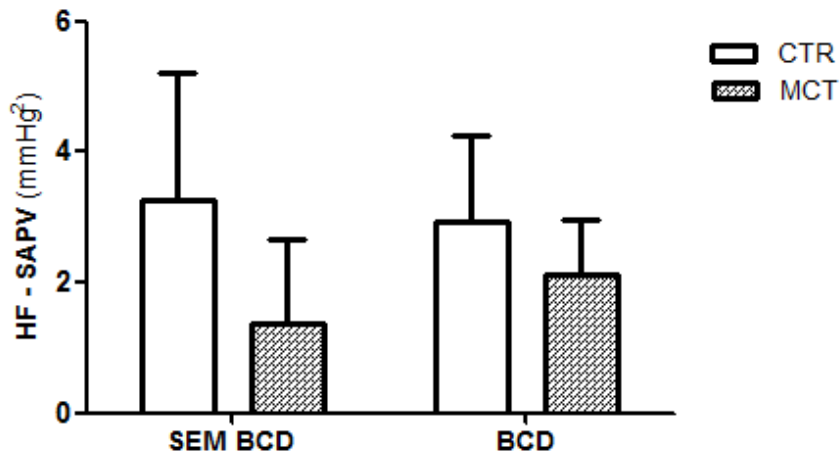
†Grupo MCT+BCD diferiu significativamente em relação ao grupo MCT SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

▽Grupo MCT SEM BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

#Grupos que receberam bucindolol (CTR+BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam bucindolol (CTR SEM BCD e MCT SEM BCD) ( $P < 0,05$ ).

### 9.6.8. Sistema Nervoso Parassimpático no Controle Vascular

A faixa de alta frequência (HF -  $\text{mmHg}^2$ ), que indica a atividade autonômica exercida pelo parassimpático sobre o sistema vascular, não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais (Figura 38).



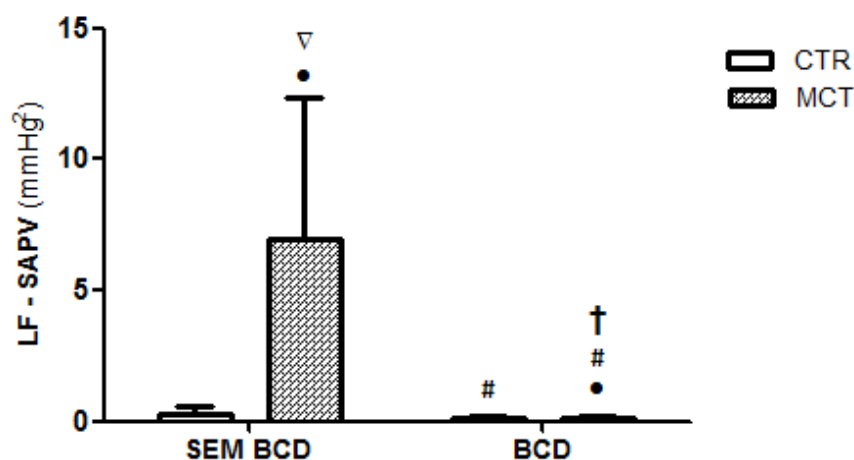
**Figura 38. Variabilidade da pressão arterial sistólica (SAPV). Faixa de alta frequência (HF) de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 4 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

Não foi observado diferença significativa entre os grupos.

#### 9.6.9. Sistema Nervoso Simpático no Controle Vascular

A faixa de baixa frequência (LF - mmHg<sup>2</sup>), que indica a atividade exercida pelo simpático sobre o sistema vascular, apresentou uma importante diminuição nos grupos tratados com o beta-bloqueador bucindolol em relação aos não tratados. Os grupos que receberam a monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) também diferiram significativamente em relação aos animais que não receberam esta droga (CTR SEM BCD e CTR+BCD), com 19 vezes mais de estimulação simpática. Ao analisarmos a diferença entre os grupos MCT SEM BCD e CTR SEM BCD, o valor acentua-se para 26 vezes mais de atividade

simpática sobre os vasos dos animais com HAP sem tratamento. Quando observarmos os animais MCT+BCD, o resultado encontrado foi uma redução de 70 vezes na estimulação simpática vascular, em relação aos animais MCT SEM BCD (Figura 39). Sendo assim, é possível pensar que os animais com HAP apresentam uma maior hiperatividade vascular, e que esta é diminuída pelo bucindolol.



**Figura 39. Variabilidade da pressão arterial sistólica (SAPV). Faixa de baixa frequência (LF) de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60mg/Kg i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2mg/Kg/dia i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 4 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR SEM BCD: animais que receberam solução salina e veículo; CTR+BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT SEM BCD: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

†Grupo MCT+BCD diferiu significativamente em relação ao grupo MCT SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

∇Grupo MCT SEM BCD diferiu significativamente em relação ao grupo CTR SEM BCD ( $P < 0,05$ ).

#Grupos que receberam bucindolol (CTR+BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam bucindolol (CTR SEM BCD e MCT SEM BCD) ( $P < 0,05$ ).

•Grupos que receberam monocrotalina (MCT SEM BCD e MCT+BCD) diferiram significativamente em relação aos grupos que não receberam monocrotalina (CTR SEM BCD e CTR+BCD) ( $P < 0,05$ ).



## 10. DISCUSSÃO

Os modelos experimentais para o estudo da HAP permitiram o desenvolvimento de todas as alternativas terapêuticas atualmente existentes (SCHERMULY *et al.* 2004; CLOZEL *et al.*, 2006). O modelo mais utilizado para mimetizar a HAP é gerado através da administração de monocrotalina (POLONIO *et al.*, 2012), uma vez que sua aplicação é simples, oferecendo facilidade e rapidez para reproduzir o modelo (GOMEZ-ARROYO *et al.*, 2012). Além disso, as alterações cardiovasculares e pulmonares geradas são muito similares às dos pacientes com HAP (YEE *et al.*, 2000), bem como os parâmetros funcionais e bioquímicos (BROWN *et al.*, 1998). Após 4 horas da aplicação da monocrotalina, já se pode observar um aumento da camada média de artérias pulmonares intracinares. Entre 8 e 16 horas após a administração, observa-se a presença de infiltrado inflamatório na camada adventícia de artérias (WILSON *et al.*, 1989). Esta injúria endotelial leva a um remodelamento vascular, produzindo uma HAP progressiva e severa (DUMITRASCO *et al.*, 2008). Por sobrecarga de pressão ao VD gera-se hipertrofia do ventrículo direito (LEICHSENRING-SILVA *et al.*, 2011) e, favorecendo este remodelamento, está a hiperatividade simpática (REMME, 2003). Este estudo se propôs a avaliar aspectos ainda pouco explorados na HAP, sendo o primeiro a utilizar o beta-bloqueador bucindolol no modelo de hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina.

Uma das características deste modelo é a diminuição do ganho de massa corporal nos animais que desenvolveram HAP (LÜDKE *et al.*, 2010). Em nosso estudo observamos que no decorrer das semanas, após a administração de



monocrotalina, enquanto os animais que receberam solução salina (CTR SEM BCD e CTR+BCD) ganhavam substancialmente massa corporal, os animais com HAP (MCT SEM BCD e MCT+BCD) apresentaram este ganho significativamente reduzido. Nossos resultados estão de acordo com Hessel *et al.* (2006), Maruyama *et al.* (2007), Lüdke *et al.* (2010) e Colombo *et al.* (2013), os quais também descrevem que após a aplicação da droga, os grupos monocrotalina apresentaram uma redução na massa corporal final em relação aos animais que receberam salina. Leineweber *et al.* (2000) observaram que os animais que receberam a injeção de monocrotalina diminuíram o consumo da ração entre a quarta e a sexta semana após a administração da droga. Ademais, a diminuição do apetite e a perda de peso são os primeiros sinais de inúmeras doenças pulmonares. As respirações rápidas e o esforço respiratório devido à progressão da doença também colaboram para aumentar o gasto de energia e, conseqüentemente, reduzir o peso corpóreo (FERNANDES e BEZERRA, 2006; MUELLER, 2002). Assim, atribuímos a diminuição de ganho de massa corpórea às alterações na atividade metabólica do organismo, provocadas pela HAP.

Ao analisarmos os índices de hipertrofia do VD, podemos observar um aumento significativo da massa ventricular direita nos animais com HAP. Sabe-se que a hipertrofia ventricular foi provocada pela sobrecarga imposta ao VD pelo aumento da resistência vascular pulmonar e aumento da pressão da artéria pulmonar (BROWN *et al.*, 1998) dos animais em que a monocrotalina foi administrada, como demonstraremos através da análise ecocardiográfica e do cateterismo ventricular. Em estudos anteriores, verificou-se o mesmo padrão de HVD na HAP (SOUZA-RABBO *et al.*, 2008; HANDOKO *et al.*, 2008). Essa

resposta é determinante para a progressão da doença, pois a hipertrofia do VD pode levar à dilatação desta câmara, insuficiência da valva tricúspide, desvio do septo interventricular e insuficiência ventricular direita, levando o acometido à morte (FRAZIER e BURKE, 2012). Embora seja reconhecido pela literatura que o bloqueio adrenérgico pode atuar no remodelamento ventricular (OKUMURA *et al.*, 2015), não foram observadas mudanças morfológicas no VD dos animais que receberam o beta-bloqueador bucindolol. Isto talvez se deva ao período relativamente curto de tratamento (7 dias), insuficiente para provocar estas alterações.

Nos pulmões dos animais que receberam monocrotalina, foi encontrado um aumento da massa total úmida e congestão pulmonar, sinais clássicos da HAP. Provavelmente, isto se deve ao fato da droga causar espessamento dos septos interalveolares, aumento da filtração capilar e infiltrado inflamatório (NOBRE *et al.*, 2004). Nossos resultados vão ao encontro dos estudos de Leineweber *et al.* (2002) e Leichsenring-Silva *et al.* (2011), que evidenciaram um aumento significativo nos índices de congestão pulmonar neste mesmo modelo animal. Nos animais com HAP que receberam o beta-bloqueador bucindolol, esta congestão foi atenuada. É descrito que a vasoconstrição decorrente da HAP é mediada por receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. Desta forma, acreditamos que esta resposta se deu em consequência da diminuição da resistência vascular pulmonar e redução da pressão da artéria pulmonar provocada por este fármaco, já que apresenta atividade antagonista  $\alpha$ -adrenérgica adicional que contribui para um efeito vasodilatador (BRISTOW, 2000). Em relação à congestão hepática, esta não apresentou diferenças significativas em nenhum dos grupos experimentais. Estes

dados conferem com os resultados obtidos por Brown *et al.* (1998), embora tenham utilizado uma dose superior (105 mg/Kg) de monocrotalina. Em estudo anterior desenvolvido em nosso laboratório, Leichsenring-Silva *et al.* (2011) também verificaram a inexistência de congestão hepática nos diferentes animais (dose de 60 mg/Kg de monocrotalina).

Além das alterações morfométricas, as pressões ventriculares nos mostram o grau de comprometimento do VD. O aumento da pressão sistólica do VD, da pressão diastólica final do VD, da  $dP/dt_{máx}$  e da  $dP/dt_{mín}$ , encontrado nos animais que receberam monocrotalina, é demonstrado na maioria dos estudos que trabalham com este modelo experimental (FALCÃO-PIRES *et al.*, 2009; LÜDKE *et al.*, 2010; COLOMBO *et al.*, 2013). Este resultado está relacionado com a resistência da vasculatura pulmonar, pois na medida que há modificação das estruturas do vaso, o aumento da resistência gera uma sobrecarga para o VD, e este por sua vez, responde com o aumento das pressões ventriculares como mecanismo para combater a sobrecarga e manter um débito cardíaco adequado (AUSTIN *et al.*, 2013). Contudo, nos animais com HAP que receberam o tratamento com bucindolol todas as alterações citadas acima reduziram radicalmente. A pressão diastólica final reflete a pressão imposta pelo volume de sangue à parede da câmara no final da diástole. A redução desta, somada ao decréscimo da pressão sistólica encontrada no VD, sugere que uma diminuição de pós-carga tenha ocorrido através do uso do beta-bloqueador. Segundo Aires (2012), o fator com maior influência na pós-carga do VD é a resistência vascular pulmonar, ou seja, para o mesmo volume de ejeção é necessária uma força contrátil muito maior. Em nosso estudo, observamos o aumento da pressão da

artéria pulmonar ( $> 25$  mmHg) nos animais com HAP. Na pesquisa de Polonio *et al.* (2014), o grupo monocrotalina apresentou valores significativamente maiores na pressão da artéria pulmonar 28 dias após a aplicação da monocrotalina. Contudo, os animais com HAP tratados com o beta-bloqueador bucindolol além de terem reduzida esta pressão, mostraram menor resistência vascular pulmonar, beneficiando o fluxo pulmonar. Eichhorn, em 1993, já descrevia que o bucindolol era capaz de reduzir a pressão da artéria pulmonar. Para Marwood e Stokes (1986), isso se deve aos efeitos do beta-bloqueador sobre os receptores adrenérgicos e a sua ação vasodilatadora. Perros *et al.* (2015) descrevem que, dado o papel dos receptores adrenérgicos na função endotelial e tônus vascular, o bloqueio destes receptores apresenta efeitos benéficos sobre a pressão da artéria pulmonar e a pressão capilar pulmonar, através da melhora da disfunção endotelial e remodelamento vascular. Destacamos o fato de o beta-bloqueador ter atenuado também os índices de contratilidade e relaxamento obtidos pelo cateterismo ventricular. Estes resultados indicam que, quando comparados os animais com HAP sem tratamento, os miócitos cardíacos dos animais com HAP que receberam o bucindolol apresentaram um perfil contrátil mais próximo dos animais controles. Assim, os animais MCT+BCD foram capazes de manter uma contratilidade elevada ( $dP/dt_{máx}$ ) concomitantemente a uma maior capacidade de relaxamento ( $dP/dt_{mín}$ ).

Observando os resultados dos animais MCT SEM BCD apresentados até o momento – redução do ganho de massa corporal, hipertrofia do VD, congestão pulmonar, pressão da artéria pulmonar maior que 25 mmHg e aumento da pressão

sistólica e diastólica final do VD – podemos afirmar que o modelo de HAP foi eficaz neste estudo.

Segundo Bogaard *et al.* (2009), uma vez que o estresse de parede não só aumenta a espessura do VD, mas também aumenta o esforço cardíaco e conseqüentemente o consumo de oxigênio, uma série de alterações bioquímicas são provocadas. Esse aumento de tensão sobre os cardiomiócitos do VD, provoca modificações na sinalização intracelular e aumento da produção de EROS. Para manter o estado redox celular, as enzimas antioxidantes desempenham um importante papel reduzindo os oxidantes intracelulares, ou seja, as EROS (LUSHCHAK, 2014). A enzima SOD é a responsável pela conversão do  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$ . A sua atividade se apresentou aumentada nos animais com HAP em relação aos animais saudáveis. No entanto, a concentração de  $H_2O_2$  não diferiu significativamente entre os grupos. A enzima CAT, que é responsável pela redução de  $H_2O_2$  à água, também mostrou uma atividade elevada nos animais que receberam a monocrotalina. Lüdke *et al.* (2010) descreveram o aumento das enzimas CAT e SOD após 21 dias da aplicação da monocrotalina em ratos Wistar. A glutathiona GPx, responsável pela detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos, reduzindo  $H_2O_2$  à água, não apresentou diferença significativa entre os animais. Este resultado vai ao encontro do estudo de Souza-Rabbo *et al.* (2008), que não encontrou diferença entre os grupos na atividade da GPx ao longo do protocolo experimental em modelo de HAP (60 mg/Kg de monocrotalina). Sabe-se que, no metabolismo celular, o oxigênio molecular passa por um processo de redução até água. Entretanto, uma pequena parte é convertida em  $O_2^{\cdot-}$  (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990). Os resultados sugerem que para

proteger as células, a enzima SOD aumenta a sua atividade para reduzir a concentração deste radical livre. Embora não tenhamos o aumento da concentração de  $H_2O_2$ , observa-se uma maior lipoperoxidação nos animais com HAP, que é ocasionada por estas espécies reativas. Corroborando com esta afirmação, é possível que a elevação na atividade da CAT esteja aumentada por aumento do seu substrato ( $H_2O_2$ ). Com relação à enzima GPx, esta não apresentou diferenças significativas porque sua biossíntese é estimulada na presença de estresse oxidativo leve, caso contrário, a CAT é a enzima que atua sobre o  $H_2O_2$ . (LUSHCHAK, 2014). Sendo assim, nesta janela temporal de 21 dias, mesmo com o aumento da lipoperoxidação não podemos afirmar que houve estresse oxidativo, uma vez que as defesas enzimáticas também estavam elevadas. Cabe destacar que o bucindolol é descrito por aumentar a funcionalidade cardíaca sem aumentar a demanda de oxigênio ao miocárdio (EICHHORN *et al*, 1990). Sabe-se que as EROs atuam sobre o crescimento e remodelamento do miocárdio através da modulação de proteínas (GIORDANO, 2005).

Após instalada a HAP, o processo de remodelamento se caracteriza, classicamente, pela alteração da geometria e redução da complacência ventricular direita. Sabe-se que a ativação compensatória do sistema nervoso simpático aumenta a contratilidade cardíaca, via receptores adrenérgicos (BRISTOW, 2011). Nesta fase, ocorre o remodelamento do VD e aumento das suas pressões intraventriculares (BOOGARD *et al.*, 2009). No entanto, o VD não consegue manter uma hipertrofia adaptativa frente a uma alta sobrecarga de pressão, e neste momento há perda da contratilidade dos cardiomiócitos e posterior evolução

para dilatação ventricular (HAMMER e McPhee, 2014). Para Voelkel *et al.* (2006), os graus de dilatação e esfericidade do VD são variáveis, mas estes fatores estão presentes invariavelmente na HAP. Mas, a diminuição encontrada no diâmetro diastólico do VD e a menor área do VD na diástole apresentada pelos animais com HAP tratados com bucindolol, sugerem a capacidade do bloqueio adrenérgico de evitar a dilatação deste ventrículo. A redução do diâmetro e da área do VD na sístole, juntamente com o aumento da fração de encurtamento, estão relacionados com a maior capacidade de geração de força contrátil do coração observada nos animais MCT+BCD em nosso estudo. Cabe ressaltar, que, em nenhum destes parâmetros ecocardiográficos de função sistólica, o grupo HAP que foi tratado com o beta-bloqueador bucindolol diferiu dos animais controle. Ao utilizarem um modelo de IC em camundongos induzido pela hiperatividade simpática, Vanzelli *et al.* (2010) verificaram que, após 8 semanas de intervenção, o uso do beta-bloqueador carvedilol propiciou uma melhora na fração de encurtamento. A comparação da área do VD entre a sístole e a diástole, chamada de mudança de área fracional do VD, que vem sendo utilizada para a avaliação da função ventricular direita em pacientes com HP (HOETTE *et al.*, 2000), demonstrou-se evidentemente aumentada nos animais MCT+BCD em relação aos animais doentes sem tratamento. Ainda, verificamos que após 21 dias da aplicação da monocrotalina, os animais que apresentavam HAP e que não receberam o tratamento, demonstravam uma redução importante no TAPSE. O resultado do TAPSE apresentado por Guihaire *et al.* (2015), 4 semanas após a indução da HAP, coincide com nosso resultado para os animais com HAP sem tratamento. Os animais com HAP tratados com o beta-bloqueador bucindolol apresentaram um

TAPSE de 0,2 cm. Sabe-se que valores de TAPSE < 0,1 cm apresentam boa acurácia para a detecção de disfunção de VD e marcador de mal prognóstico, já que valores de TAPSE > 0,2 cm são considerados valores normais (HUMBERT *et al.*, 2013). Desta forma, o melhor desempenho cardíaco e de função sistólica deve-se à contratilidade cardíaca aumentada, um efeito deste fármaco, descrito por EICHHORN *et al.* (1990). Esta melhora contrátil foi confirmada através de métodos relativamente independentes, ecocardiografia e cateterismo do VD que foi descrito anteriormente.

Os dados também revelam que, em comparação aos animais controle, houve diminuição da relação E/A nos animais com HAP, indicando presença de disfunção diastólica. Segundo Gan *et al.* (2007), o enchimento do VD de pacientes com HAP é, em sua maior parte, dependente da contração atrial. Apesar de não termos encontrado diferença estatisticamente significativa na disfunção diastólica entre os grupos monocrotalina, o grupo HAP que recebeu o beta-bloqueador apresentou-se mais próximo dos níveis fisiológicos. Acreditamos dever-se ao fato de que a função diastólica prejudicada nos pacientes com HAP pode ser atenuada com a diminuição de pós-carga, resultado encontrado em nossa pesquisa.

Neste trabalho, os animais com HAP sem tratamento apresentaram valores superiores no índice de performance miocárdica quando comparados aos animais doentes que receberam o tratamento com bucindolol. Este índice está relacionado com o esforço que o miocárdio exerce para manter sua função como bomba (KAKOUIROS *et al.*, 2011). Em um estudo de 2011, Leichsenring-Silva e seus colaboradores observaram uma correlação entre o aumento da resistência promovido pela HAP e o aumento do esforço do miocárdio. Ao analisarmos



nossos resultados, o grupo MCT SEM BCD apresentou valores altos neste índice, e se associarmos com a redução no débito cardíaco destes animais, podemos inferir que os animais com HAP sem tratamento se encontravam em um estado descompensado. Contrariamente, os animais com HAP tratados, apresentaram um índice de performance miocárdica reduzido e um aumento de 20% no débito cardíaco, conforme descrito anteriormente. O índice de performance do miocárdio (IPM), tem sido usado como um parâmetro do esforço cardíaco tanto em estudos clínicos como em experimentais (KAKOUROS *et al.*, 2011). A diminuição neste índice encontrada nos animais com HAP que receberam bucindolol, indica um menor esforço do miocárdio, podendo ser um fator contribuinte para subsequente desenvolvimento da IC.

O enfoque do presente estudo foi a relação da hiperatividade simpática induzida pela HAP no desenvolvimento da HVD e na disfunção sistólica e diastólica deste ventrículo. Para avaliarmos se a hipótese de que a redução da atividade simpática seria benéfica para ratos com HAP, foi necessário realizarmos todas as análises descritas no decorrer desta discussão. Sabemos que o sistema nervoso simpático tem influências sobre o sistema cardiovascular, uma vez que a noradrenalina liberada no coração, modifica o débito cardíaco por alterar a FC e a força de contração das fibras do miocárdio. Nos vasos, a noradrenalina atua sobre o estado contrátil do músculo liso, resultando em aumento da resistência vascular (FRANCHINI *et al.*, 1996; COWLEY *et al.*, 1996). Além disso, o simpático pode desempenhar um efeito trófico sobre as células musculares lisas e miocárdicas (VICTOR e MARK, 1995). Para avaliarmos a função simpática na HAP, utilizamos

a variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial nos domínios do tempo e da frequência (análise espectral).

Para manter o débito cardíaco, os animais com HAP tendem a apresentar um aumento da FC, pela maior descarga simpática (MINAI *et al.*, 2015). Contudo, a FC não diferiu entre nenhum dos grupos experimentais. Estudos envolvendo animais com hipertensão pulmonar têm mostrado resultados controversos tanto apresentando aumento (SANYAL e ONO, 2002) como diminuição (HESSEL *et al.*, 2006) na FC. Segundo Usui *et al.* (2006), animais com HAP apresentam um aumento na concentração plasmática de noradrenalina. Porém, acreditamos que a falta de alteração na FC em nosso estudo possa ser provavelmente consequência da redução de receptores alfa e beta-adrenérgicos promovidas pela HAP (LEINEWEBER *et al.*, 2003; WALLUKAT *et al.*, 2003). Neste mesmo modelo experimental, Oriowo *et al.* (2003) verificaram que a exposição prolongada dos receptores cardiovasculares a altas concentrações de noradrenalina ocasionou *down regulation* destes receptores. Isto justificaria a tendência de redução na FC observada nos animais MCT SEM BCD. Com relação ao componente LF normalizado, ou seja, a ativação do sistema nervoso simpático, nossos resultados estão de acordo com os dados publicados que demonstram a hiperatividade simpática neste modelo (GONÇALVES *et al.*, 2010). Quanto à participação do sistema nervoso parassimpático, este se encontra reduzido nos animais MCT SEM BCD. Rigatto *et al.* (2013), após 21 dias da indução da HAP com 50 mg/Kg de monocrotalina, descreveram ser a doença capaz de diminuir a atividade parassimpática. Segundo De Angelis *et al.* (2004), uma menor ativação parassimpática contribui para uma maior variabilidade da pressão arterial. Além

disso, a preservação do sistema parassimpático tem um papel protetor para o miocárdio, provavelmente por alterações dos mecanismos de excitabilidade da célula cardíaca (MALIK e CANN, 1993). O tratamento com o beta-bloqueador bucindolol modulou o sistema nervoso autônomo no modelo de HAP induzida por monocrotalina. Ou seja, além de diminuir claramente o tônus simpático, bucindolol ainda aumentou o tônus parassimpático. Esta resposta também fica evidenciada pela reversão que o beta-bloqueador fez sobre o desequilíbrio simpato-vagal, e o aumento da variabilidade da pressão arterial. Também se fez necessária a avaliação da variabilidade da frequência cardíaca, uma vez que a diminuição na capacidade do coração de variar a sua frequência corresponde a um importante fator prognóstico para o aparecimento de eventos cardíacos em indivíduos previamente saudáveis e em portadores de cardiopatias (REIS e GOLANOV, 1997; PERLINI *et al.*, 2005). Rigatto *et al.* (2013) demonstraram uma diminuição da variabilidade da frequência cardíaca nos animais com HAP. Nossos resultados não demonstram uma diferença significativa entre os grupos experimentais. Como os componentes da FC (faixas HF e LF) e o balanço simpato-vagal indicam que o beta-bloqueador bucindolol promoveu retorno aos valores normais de modulação autonômica na HAP, acreditamos que a diferença na VFC não foi observada devido ao desvio padrão. Ademais, a administração de beta-bloqueadores na IC tem demonstrado o aumento da VFC, indicando um efeito protetor sobre o sistema cardiovascular (VYBIRAL *et al.*, 1993; LA ROVERE *et al.*, 1994). Uma das razões pela qual as diretrizes atuais relutam em utilizar os beta-bloqueadores para o tratamento da HAP é o temor de hipotensão sistêmica (GALIÈ *et al.* 2009). Além de atuar na regulação do tônus simpático vascular, o bucindolol não acarretou

diminuição na pressão arterial sistêmica, e foi, portanto, bem tolerado pelos animais com HAP. Man *et al.* (2012), ao avaliarem o efeito do beta-bloqueador bisoprolol na hipertensão pulmonar experimental, encontraram uma diminuição moderada na pressão arterial sistêmica dos animais tratados.

Em nosso estudo, tornou-se claro que o bloqueio adrenérgico promoveu uma melhora funcional no VD após a avaliação ecocardiográfica. Vinte e um dias após a aplicação da monocrotalina, os animais com HAP tratados com bucindolol, diferentemente dos animais com HAP sem tratamento, aumentaram o débito cardíaco e o volume sistólico. Handoko *et al.* (2009) demonstraram que o exercício aeróbico exerceu efeitos positivos sobre o débito cardíaco e volume sistólico apenas em um modelo de HAP mais leve (40 mg/Kg de monocrotalina). Já Okumura *et al.* (2015) obtiveram um maior débito cardíaco em um modelo de HAP com 60 mg/Kg de monocrotalina, através do tratamento com carvedilol (15 mg/Kg dia – 3 semanas). Está bem descrito na literatura que a hiper-estimulação do sistema nervoso simpático é acompanhada de um aumento do trabalho do miocárdio e diminuição do débito cardíaco (BRISTOW, 2011; RIENSTRA *et al.*, 2013). Ensaio clínico inicial com bucindolol foram realizados no início da década de 1990. Neste estudo, Gilbert e seu grupo de pesquisa randomizaram 24 pacientes com o diagnóstico de insuficiência cardíaca sintomática para receber bucindolol ou placebo durante dois meses. Ao final, os doentes tratados com bucindolol aumentaram o débito cardíaco significativamente em relação aos doentes placebo. Em 2003, Eichhorn e seus colaboradores publicaram na revista *Circulation* que após 3 meses de terapia com bucindolol, pacientes com insuficiência cardíaca crônica apresentavam melhora no volume sistólico. Assim,

neste estudo, evidenciamos um volume sistólico e débito cardíaco preservados nos animais MCT+BCD devido à ação do beta-bloqueador bucindolol.

O bucindolol promoveu efeitos na função sistólica encontrada, sugerindo que o aumento no débito cardíaco e volume sistólico advêm de uma melhora na contratilidade promovida. Este fármaco foi capaz de atenuar as alterações hemodinâmicas, congestão pulmonar e a elevação da pressão da artéria pulmonar, sinal clássico da HAP. Além disso, a manifesta modulação do sistema nervoso autônomo cardíaco e vascular ocasionada pelo beta-bloqueador bucindolol, foi fator contribuinte para atenuar a disfunção do VD causada por esta patologia.

## 11. CONCLUSÃO

Os resultados do estudo permitem concluir que:

- A aplicação de monocrotalina foi efetiva em induzir a hipertensão arterial pulmonar.
- Os animais que receberam monocrotalina apresentaram uma redução no ganho de massa corporal, provocada pela HAP.
- O bucindolol não foi eficaz na redução da HVD, promovida pelo aumento da pós-carga encontrada na doença.
- Apesar de não encontradas alterações no índice de congestão hepática, a HAP foi capaz de causar congestão pulmonar. Porém, nos animais com HAP que receberam o beta-bloqueador bucindolol, esta congestão foi atenuada.
- Os animais MCT+BCD além de apresentarem redução nas pressões ventriculares sistólica e diastólica final do VD, foram capazes de manter uma contratilidade elevada concomitantemente a uma maior capacidade de relaxamento.
- O bucindolol atuou na melhora da função sistólica do VD, através de uma melhor contratilidade promovida por este beta-bloqueador. Além disso, minimizou a RVP e PAP neste modelo de HAP, tornando menor o esforço do miocárdio para exercer sua função de bomba.
- A HAP promoveu alterações no controle autonômico cardíaco e vascular. Contudo, o tratamento com bucindolol modulou o sistema nervoso

autônomo, através da redução da atividade simpática e aumento da parassimpática.

- A HAP induzida pela monocrotalina aumentou a lipoperoxidação e a atividade das enzimas antioxidantes. O bucindolol não foi eficaz em reduzir o aumento da lipoperoxidação encontrado nestes animais.

## 12. PERSPECTIVAS

- Analisar as alterações estruturais nos cardiomiócitos do VD (número de cardiomiócitos, hipertrofia, volume de matriz extracelular, volume de vasos e fibrose) através da análise histológica.
- Avaliar proteínas envolvidas em vias de sinalização intracelular para hipertrofia.



### 13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, U. R.; Heart rate variability: a review. **Medical and Biological Engineering and Computing**, 2006; 44(12):1031-1051.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, 1984; 105:121-126.

AFANAS'EV, I. ROS and RNS signaling in heart disorders: could antioxidant treatment be successful? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2011.

ALEONG, R. G. New-onset atrial fibrillation predicts heart failure progression. **The American Journal of Medicine**, 2013; 127:963-971.

ALVES, J. L. et al. Pulmonary arterial hypertension in the Southern hemisphere: results from a registry of incidente Brazilian cases. **Chest**, 2015; 147(2):495-501.

AMIN, J. Reactive oxygen species mediate  $\alpha$ -adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 2001; 33:131-139.

ANDERSEN, S. et al. Sympathetic nervous system activation and  $\beta$ -adrenoceptor blockade in right heart failure. **European Journal of Heart Failure**, 2015; 17(4):358-366.

ANGELIS, K. de et al. Sistema nervoso autônomo e doença cardiovascular. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, 2004; 3:1-7.

ATALA, M. M.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M. Influência dos polimorfismos dos genes dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos na regulação cardiovascular e no desenvolvimento das doenças cardiovasculares. **Revista Brasileira de Hipertensão**, 2007; 14(4):258-264.

AUBERT, A. E. et al. Heart rate variability in athletes. **Sports Medicine**, 2003; 33(12):889-919.

AUSTIN, E. D. et al. Gender, sex hormones and pulmonary hypertension. **Pulmonary Circulation**, 2013; 3(2):294-314.

AYRES, M. de M. **Fisiologia**. 4<sup>o</sup> edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

BADESCH, D. B. et al. Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, 2009; 54(1):55-66.

BADESCH, D. B. et al. Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL registry. **Chest**, 2010; 137:376-387.

BAKER, J. G. et al. Predicting in vivo cardiovascular properties of b-blockers from cellular assays: a quantitative comparison of cellular and cardiovascular pharmacological responses. **The FASEB Journal**, 2011; 25:4486-4497.

BANDYOPADHYAY, D. et al. Outcomes of  $\beta$ -blocker use in pulmonary arterial hypertension: a propensity matched analysis. **European Respiratory Journal**, 2015; 46:750-760.

BATLOUNI, M.; ALBUQUERQUE, D. C. de. Bloqueadores beta-adrenérgicos na Insuficiência Cardíaca. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2000; 75(4):339-349.

BISWAS, S.K.; RAHMAN, I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. **Molecular Aspects of Medicine**, 2009, 30:60-76.

BLACK-MAIER, E. et al. Bucindolol hydrochloride in atrial fibrillation and concomitant heart failure. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, 2015; 1-10.

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

BORTOLOTTI, L. A.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M. Betabloqueadores adrenérgicos. **Revista Brasileira de Hipertensão**, 2006; 16(4):215-2204.

BOSCO, F. A. P.; BRAZ, J. R. C. Beta-bloqueadores em anestesiologia: aspectos farmacológicos e clínicos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 2001; 51(5):431-447.

BRISTOW, M. R.  $\beta$ -adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. **Circulation**, 2000; 101:558-569

BRISTOW, M. R. Treatment of chronic heart failure with beta-adrenergic receptor antagonists: a convergence of receptor pharmacology and clinical cardiology. **Circulation Research**, 2011; 109:1176-1194.

BRODDE, O. E. Beta-adrenoceptors in cardiac disease. **Pharmacology e Therapeutics**, 1993; 60(3):405-430.

BROURI, F. et al. Blockade of beta 1 and desensitization of beta 2-adrenoceptors reduce isoprenaline-induced cardiac fibrosis. **European Journal Pharmacology**, 2004; 485:227-234.

BROWN, L. et al. Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats. **Journal Cardiovascular Research**, 1998; 31(1):108-115.

BRUM, P. C. et al. Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. **American Journal of Physiology Heart Circulatory Physiology**, 2002; 283(5):1838-1845.

CASOLO, G. C. et al. Heart rate variability during the acute phase of myocardial infarction. **Circulation**, 1992; 85(6):2073-2079.

CASSERLY, B.; KLINGER, J. R. Brain natriuretic peptide in pulmonary arterial hypertension: biomarker and potential therapeutic agent. **Drug Des Devel Ther**, 2009; 3:269-287.

CHAN, S. Y.; LOSCALZO, J. Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 2008; 44(1):14-30.

CHATTERJEE, S. et al. Benefits of  $\beta$  blockers in patients with heart failure and reduced ejection fraction: network meta-analysis. **BMJ**, 2013; 346:596.

CHEMLA, D. et al. Haemodynamic evaluation of pulmonary hypertension. **European Respiratory Journal**, 2002; 20:1314-1331.

CHEN, W. Right ventricular systolic pressure measurements in combination with harvest of lung and immune tissue samples in mice. **Journal of Visualized Experiments**, 2013; 71:1-9.

CHIN, K. M.; RUBIN, L. J. Pulmonary arterial hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, 2008; 51(16):1527-1538.

CHIZZOLA, P. R. et al. The effect of  $\beta$ -adrenergic receptor antagonism in cardiac sympathetic neuronal remodeling in patients with heart failure. **International Journal Cardiology**, 2006; 106(1): 29-34.

CHRISTOPHER, M. Exercise-associated oxidative stress. **Clinical Techniques in Equine Practice**, 2003; 2:278-291.

CIARKA, A. V. et al. Prognostic significance of sympathetic nervous system activation in pulmonary arterial hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2010; 181(11):1269-1275.

COLOMBO, R. et al. Effects of exercise on monocrotaline-induced changes in right heart function and pulmonary artery remodeling in rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 2013, 91:38-44.

COLOMBO, R. et al. Aerobic exercise promotes a decrease in right ventricle apoptotic proteins in experimental cor pulmonale. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, 2015; 66(3):246-253.

COHN, J. N. et al. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. **The New England Journal of Medicine**, 1984; 311:819-23.

CLOZEL, M. Bosentan, sildenafil, and their combination in the monocrotaline model of pulmonary hypertension in rats. **Experimental Biology and Medicine**, 2006; 231(6):967-73.

COWLEY, J. C. et al. Autonomic control of blood vessels. In: Robertson D. **Primer on the autonomic nervous system**. San Diego: Academic Press, 1996.

DAICHO, T. et al. Alterations in pharmacological action of the right ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 2009; 32(8):1378-1384.

DEVIC, E. et al. Beta-adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from beta (1) and beta (2) adrenoceptor knockout mice. **Molecular Pharmacology**, 2001; 60(3):577-583.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Reviews**, 2002; 82:47-95.

DUARTE, D. R. et al. Efeitos da administração de beta-bloqueador na remodelação ventricular induzida pelo tabagismo em ratos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2009; 92(6):479-483.

DUMITRASCO, R. S. et al. Characterization of a murine model of monocrotalina pyrrole-induced acute lung injury. **BMC Pulmonary Medicine**, 2008; 8:25.

EICHHORN, E. J. et al. Effect of beta-adrenergic blockade on myocardial function and energetics in congestive heart failure. Improvements in hemodynamic performance, contractile and diastolic bucindolol. **Circulation**, 1990; 82(2):473-483.

EICHHORN, E. J. Effects of bucindolol in heart failure. **The American Journal of Cardiology**, 1993; 71(9):65-70.

EICHHORN, E. J. Myocardial contractile reserve by dobutamine stress echocardiography predicts improvement in ejection fraction with b-blockade in patients with heart failure. The b-blocker evaluation of survival trial (BEST). **Circulation**. 2003; 108:2336-2341

FALCÃO-PIRES, I. et al. Apelin decreases myocardial injury and improves right ventricular function in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, 2009; 296:2007-2014.

FARAHAMAND, F. et al. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2004; 260:21-29.

FARHAT, M. Y. et al. Protection by o estradiol against the development of cardiovascular changes associated with monocrotaline pulmonary hypertension in rats. **British Journal of Pharmacology**, 1993; 110(2):719-723.

FERNANDES, C. J. dos S. et al. Survival in schistosomiasis-associated pulmonary arterial hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, 2010; 56(9):715-720.

FERNANDES, A. C.; BEZERRA, O. M. de P. A. Terapia nutricional na doença pulmonar obstrutiva crônica e suas complicações nutricionais. **Revista Brasileira de Pneumologia**, 2006; 32(5):461-471.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 1997; 43(1):61-68.

FERREIRA, F. et al. Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: Influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, 2008; 7(2) 257-275.

FERREIRA, F. et al. Estresse oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, 2006, 7:257-275.

FLOHE, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, 1984; 105: 114-121.

FLORES, A.S.; MIOTTO, S.T.S. 2005. Aspectos fitogeográficos das espécies de *Crotalaria L.* na região Sul do Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, 2005;19(2): 245-249.

FRAGOSO, M. C. B. V. Manifestações endócrinas das mutações da proteína Gs alfa e do imprinting do gene GNAS1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, 2002; 46:372-380.

FRANCHINI, K. G. et al. Autonomic control of cardiac function. In: Robertson D. **Primer on the Autonomic Nervous System**. San Diego: Academic Press, 1996.

FRAZIER, A. A.; BURKE, A. P. Opposite effects of training in rats with stable and progressive pulmonary hypertension. **Seminars in Ultrasound, CT, and MRI**, 2012; 33(6):535-551.

GALIÈ, N. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. **European Respiratory Journal**, 2009; 34:1219-1263.

GAN, C. T. Noninvasively assessed pulmonary artery stiffness predicts mortality in pulmonary arterial hypertension. **Chest**. 2007;132(6):1906-1912.

GERHARDSTEIN B. L. et al. Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. **Biochemistry**, 1999; 38(32):10361-10370.

GILBERT, E. M. et al. Long-term beta-blocker vasodilator therapy improves cardiac function in idiopathic dilated cardiomyopathy: a double-blind, randomized study of bucindolol versus placebo. **The American Journal of Medicine**, 1990; 88(3):223-229.

GIORDANO, F. J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure. **The Journal of Clinical Investigation**, 2005; 115(3):500-508.

GOMEZ-ARROYO, J. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. **American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology**, 2012; 302:363-369.

GONÇALVES, H. Analysis of heart rate variability in a rat model of induced pulmonary hypertension. **Medical Engineering e Physics**, 2010; 32(7):746-52.

GROEPENHOFF, H. et al. Prognostic relevance of changes in exercise test variables in pulmonary arterial hypertension. **PLoS One**, 2013; 8(9): e72013.

GRUNIG, E. et al. Non-invasive diagnosis of pulmonary hypertension: ESC/ERS guidelines with updated commentary of the cologne consensus conference. **International Journal of Cardiology**, 2011; 154(1):3-12.

GUIHAIRE, J. Sex differences in immunology: more severe development of experimental pulmonary hypertension in male rats exposed to vascular endothelial growth factor receptor blockade. **BioMed Research International**, 2015.

GUIMARÃES, J. I. et al. Revisão das II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o Diagnóstico e Tratamento da Insuficiência Cardíaca. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2002; 79(4):1-30.

GUYTON, A.; HALL, J. **Textbook of medical physiology**. 10<sup>o</sup> edição. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000.

GURTU, V.; MICHELAKIS, E. D. Emerging therapies and future directions in pulmonary arterial hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, 2015; 31(4):489-501.

HALL, S.A. et al. Time course of improvement in left ventricular function, mass and geometry in patients with congestive heart failure treated with beta-adrenergic blockade. **Journal of the American College of Cardiology**, 1995; 25(5):1154-1161.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3<sup>o</sup> edição. New York: Oxford, 1999.

HANDOKO, M. L. et al. Opposite effects of training in rats with stable and progressive pulmonary hypertension. **Circulation**, 2009; 120(1):42-49.

HAMMER, G. D.; McPHEE, S. J. **Pathophysiology of disease: an introduction to clinical medicine**. 7<sup>o</sup> edição. New York: McGraw-Hill Education, 2014.

HEIN, S. et al. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. **Circulation**, 2003; 107(7):984-991.

HESSEL, M. H. M. et al. Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, 2006; 291:2424-2430.

HÖCHT, C. **Blood pressure variability: prognostic value and therapeutic implications**. **Hypertension**, 2013.

HOETTE, S. et al. Diagnóstico e tratamento da hipertensão pulmonar: uma atualização. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 2010; 36(6):795-811.

HOEPER, M. M.; GRANTON, J. Intensive care unit management of patients with severe pulmonary hypertension and right heart failure. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2011; 184:1114-1124.

HOEPER, M. M.; GIBBS, S. R. The changing landscape of pulmonary arterial hypertension and implications for patient care. **European Respiratory Review**, 2014; 23:450-457.

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**, 2003; 285(6):1473-1480.

HUMBERT, M. et al. **Pharmacotherapy of pulmonary hypertension**. New York: Springer, 2013.

HUMBERT, M.; HOSSEIN-ARDESCHIR, G. The molecular targets of approved treatments for pulmonary arterial hypertension. **BMJ - Thorax**, 2015; 0:1-11.

HUNT, S. A. et al. A guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). **Journal of the American College of Cardiology**, 2001; 38(7):2101-2113.

IRIGOYEN, M. C. et al. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Revista Brasileira de Hipertensão**, 2001; 8(1):55-62.

JANSA, P. et al. Epidemiology and long-term survival of pulmonary arterial hypertension in the Czech Republic: a retrospective analysis of a nationwide registry. **BMC Pulmonary Medicine**, 2014; 14:45.

JESPERSEN, B. Femoral arterial and venous catheterization for blood sampling, Drug administration and conscious blood pressure and heart rate measurements. **Journal of Visualized Experiments**, 2012; 59.

JONES, J. E. et al. Serial noninvasive assessment of progressive pulmonary hypertension in a rat model. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, 2002; 283(1):364-71.

KAKOUIROS, N. et al. Tissue doppler imaging of the tricuspid annulus and myocardial performance index in the evaluation of right ventricular involvement in the acute and late phase of a first inferior myocardial infarction. **Ecocardiography**, 2011; 28(3):311-319.

KARLEN-AMARANTE et al. Altered baroreflex and autonomic modulation in monosodium glutamate-induced hyperadipose rats. **Metabolism Clinical and Experimental**, 2012; 61(10): 1435-1442.

KAUL, N. Free radicals and the heart. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, 1993; 30(2): 55-67.

KHAPER, N. et al. Targeting the vicious inflammation-oxidative stress cycle for the management of heart failure. **Antioxidants e Redox Signaling**, 2010; 13(7): 1033-1049.

KIELY, D. G. et al. Pulmonary hypertension: diagnosis and management. **BMJ**, 2013; 346:f2028.

KOSKENVUO, J. W. et al. A comparison of echocardiography to invasive measurement in the evaluation of pulmonary arterial hypertension in a rat model. **The international journal of cardiovascular imaging**, 2010; 26(5):509-518.

LAPA, M. et al. Cardiopulmonary manifestations of hepatosplenic schistosomiasis. **Circulation**, 2009; 119(11):1518-23.

LAPA, M.S. et al. Clinical characteristics of pulmonary hypertension patients in two reference centers in the city of Sao Paulo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 2006, 52: 139-143.

LA ROVERE, M. T. et al. Scopolamine improves autonomic balance in advanced congestive heart failure. **Circulation**, 1994; 90(2): 838-843.

LEE, J.; GIORDANO, S.; ZHANG, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling. **The Biochemical Journal**, 2012; 441(2):523–540.

LEICHSENTRING-SILVA, F. et al. Association of the time course of pulmonary arterial hypertension with changes in oxidative stress in the left ventricle. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 2011, 38:804-810.

LEINWEBER, K. et al. Chamberspecific alterations of noradrenaline uptake in right ventricles of monocrotaline-treated rats. **British Journal of Pharmacology**, 2000; 131:1438-1444.

LIAO, J. K. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. **The Journal of clinical investigation**, 2013; 123(2):540–541.

LLESUY, S.F. et al. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. **Tumori**. 71:241-249, 1985.

LOHSE, M. J. et al. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? **Circulation Research**, 2003; 93:896-906.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, 1951; 193(1):265-275.

LÜDKE, A. R. et al. Modulation of monocrotaline-induced cor pulmonale by grape juice. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, 2010; 55(1):89-95

LYMPEROPOULOS, A. et al. Adrenergic nervous system in heart failure pathophysiology and therapy. **Circulation Research**, 2013; 739-753.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, 2014; 224:164-175.

MALENFANT, S. et al. The emergence of new therapeutic targets in pulmonary arterial hypertension: from now to the near future. **Expert Review of Respiratory Medicine - Expert Reviews**, 2013; 7(1):43-55.

MALIK, M.; CANN, A. J. Heart rate variability: from facts to fancies. **Journal of the American College of Cardiology**, 1993; 22(2):566-568.

MAN, F. S .de et al. Bisoprolol delays progression towards right heart failure in experimental pulmonary hypertension. **Circulation Heart Failure**, 2012; 5(1):97-105.



MAN, F. S. de; HANDOKO, M. L.  $\beta$ -blockers in pulmonary arterial hypertension: evolving concepts of right heart failure. **Pulmonary Vascular Diseases**, 2015; 46:619-621.

MARKLUND, S. **Autoxidação do pirogalol**. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. EUA: Boca Raton, 1985.

MARTINEZ, S. T. et al. A determinação estrutural do alcaloide pirrolizidínico monocrotalina: exemplo dos desafios da química de produtos naturais até os anos sessenta do século XX. **Revista Virtual de Química**, 2013; 5(2):300-311.

MARUYAMA, H. et al. Granulocyte colony-stimulating factor prevents progression of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. **Circulation Journal**; 71:138-143.

MARWOOD, J. F.; STOKES, G. S. Studies on the vasodilator actions of bucindolol in the rat. **Clinical and Experimental – Pharmacology and Physiology**, 1986; 13(1):59-68.

MEYER, G. M. B. et al. Hipertensão pulmonar: avanços terapêuticos. **Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, 2004; 13(1):1-6.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte. **Journal of Biological Chemistry**, 1969; 244: 6049-6055.

McCRORY, D. C. et al. Pulmonary arterial hypertension: screening, management, and treatment. **Comparative Effectiveness Reviews**, 2013; 117:1-23.

McGOON M. D. et al. Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. **Journal of the American College of Cardiology**, 2013; 62:51-59.

MEYRICK, B. et al. Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. **The American Journal of Physiology**, 1980; 239(5):692-702.

MINAI, O. A. Heart rate recovery is an important predictor of outcomes in patients with connective tissue disease-associated pulmonary hypertension. **Pulmonary Circulation**, 2015; 5(3):565-576.

MONTANI, D. et al. Pulmonary arterial hypertension. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, 2013; 8(1):97.

MONTANO, N. et al. Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. **Circulation**, 1994; 90(4):1826-1831.

MONTANO, N. et al. Heart rate variability explored in the frequency domain: A tool to investigate the link between heart and behavior. **Euroscience e Biobehavioral Reviews**, 2009; 33(2):71-80.

MOSELE, F. et al. Effects of purple grape juice in the redox-sensitive modulation of right ventricular remodeling in a pulmonary arterial hypertension model. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, 2012; 60(1):15-22.

MUELLER, D. Terapia clínica nutricional na doença pulmonar. In: MAHAN, L. K. et al. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 10<sup>o</sup> edição. São Paulo: Roca; 2002.

MURPHY, M. P.; HOLMGREN, A. Unraveling the Biological Roles of Reactive Oxygen Species. **Cell Metabolism**, 2011; 13(4):361-366.

NETO, M. A. et al. Receptores beta-adrenérgicos no sistema cardiovascular. **Revista Medicina**, 2006; 39(1):3-12.

NEWBY, A. C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. **Cardiovascular research**, 2006; 69(3):614-624.

NOBRE, V. M. T. et al. Intoxicação por crotalária retusa em equídeos do semi-árido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2004; 24(3):132-143.

O'CONNOR, C. M. et al. Combinatorial pharmacogenetic interactions of bucindolol and  $\beta_1$ ,  $\alpha_2C$  adrenergic receptor polymorphisms. **Plos One**, 2012; 7(10).

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, 1979; 95(2): 351-358.

OKADA, M. Role of endothelin-1 in beagles with dehydromonocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Circulation**. 1995;92:114 –119.

OKUMURA, K. et al. Carvedilol improves biventricular fibrosis and function in experimental pulmonary hypertension. **Journal of Molecular Medicine**, 2015; 93:663-674

ORIOWO, M. A. Alpha-1 adrenoceptor subtypes mediating noradrenaline-induced contraction of pulmonary hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, 2003; 482:255-263.

PALOMINO, G. VÁSQUEZ, R. Cytogenetic studies in mexican populations of species of *Crotalaria* (Leguminosae - Papilionoideae). **Cytologia**, 1991; 56:343-351.

PAN et al. Red blood cells augment transport of reactive metabolites of monocrotaline from liver to lung in isolated and tandem liver and lung preparations. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 1991; 110(2): 336-346.

PEACOCK, A. J. et al. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. **European Respiratory Journal**, 2007; 30(1):104-109.

PEREIRA, T. N. et al. Dehydromonocrotaline generates sequence-selective N-7 guanine alkylation and heat and alkali stable multiple fragment DNA crosslinks. **Nucleic Acids Research**, 1988; 26(23):5441-5447.

PEREIRA et al. Os polimorfismos dos receptores adrenérgicos na insuficiência cardíaca: o que a genética explica? **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2010; 94(6): 841-849.

PERLINI, S. et al. Sympathectomy or doxazosin, but not propranolol, blunt myocardial interstitial fibrosis in pressure-overload hypertrophy. **Hypertension**, 2005; 46: 1213-1218.

PERROS et al. Nebivolol for improving endothelial dysfunction, pulmonary vascular remodeling, and right heart function in pulmonary hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, 2015; 65(7):668-680.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunological Methods**, 1980; 38(1-2):161-170.

POLJSAK, B. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2011.

POLONIO, I. B. et al. Comparison of two experimental models of pulmonary hypertension. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 2012; 38(4):452-460.

POLONIO, I. B. et al. Tratamento com lodenafila no modelo de hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina em ratos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 2014; 40(4):421-424.

PRADA, L. F. L. Classificação da hipertensão pulmonar. **Revista Paulista de Reumatologia**, 2014; 13(2): 6-15.

PTSEY, P. S. Usefulness of beta-blocker therapy and outcomes in patients with pulmonary arterial hypertension. **The American Journal of Cardiology**, 2012; 109(10): 1504-1509.

PU, M. et al. Effects of early, late, and long-term nonselective  $\beta$ -Blockade on left ventricular remodeling, function, and survival in chronic organic mitral regurgitation. **Circulation: Heart Failure**, 2013; 6:756-762.

RABINOVITCH, M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. **The Journal of Clinical Investigation**, 2008; 118:2372-2379.

RÄISÄNEN, S. et al. Cronic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. **FASEB Journal**, 1999; 13:513-522.

RAJENDRA, A. U. et al. Heart rate variability: a review. **Medical e Biological Engineering e Computing**, 2006; 44(12):1031-1051.

RAMOS, M. F. et al. Smad signaling in the rat model of monocrotaline pulmonary hypertension. **Toxicologic Pathology**, 2008; 36(2):311-320.

RENDQVIST, B. et al. Increased cardiac adrenergic drive precedes generalized sympathetic activation in human heart failure. **Circulation**, 1997; 95:169-175.

RHEE, S. G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. **Experimental & molecular medicine**, 1999; 31(2):53-599.

REIS, A. et al. Recomendações para a abordagem clínica do doente com hipertensão pulmonar. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, 2010; 29(2):253-289.

REIS, D. J.; GOLANOV, E. V. Autonomic and vasomotor regulation. *International Review of Neurobiology*; 1997; 41:121-149.

REMME, W. J. Pharmacological modulation of cardiovascular remodeling: a guide to heart failure therapy. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, 2003; 17(4): 349-360.

RHODEN, E. L.; RHODEN, C. R. **Princípios e técnicas em experimentação animal**. 1<sup>o</sup> edição. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2006.

RIGATTO, K. et al. Diminazene aceturate improves autonomic modulation in pulmonary hypertension. **European Journal of Pharmacology**, 2013; 713: 89-93.

RIENSTRA, M. et al. Beta-blockers and outcome in heart failure and atrial fibrillation: a meta-analysis. **JACC Heart Failure**, 2013; 1:21-28.

ROBLES, A.; SHURE, D. Gender issues in pulmonary vascular disease. **Clinics in Chest Medicine**, 2004; 25:373-377.

ROMANO, S. E. Revisão conceitual de hipertensão pulmonar. **Pulmão RJ**, 2010; 19:33-39.

RUBIN, L. J. Diagnosis and management of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. **Chest**, 2004; 126(1):7-10.

RUBIN, L. J. The beta-adrenergic receptor in pulmonary arterial hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, 2015; 65(7): 681-683.

RUDSKI, L. G. et al. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and t. **Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography**, 2010; 23(7):685-713.

RUFINO, R. et al. Hipertensão arterial pulmonar: uma proposta multidisciplinar. **Revista Hospital Universitário Padre Ernesto**, 2013; 12(1):61-73.

RUNO, J. R.; LOYD, J. E. Primary pulmonary hypertension. **Lancet**, 2003; 361:1533-1544.

RUWALD, M. H. et al. Effect of metoprolol versus carvedilol on outcomes in MADIT-CRT. **Clinical Research**, 2013; 61(14):1518-1526.

SAMJOO, I. A et al. The effect of endurance exercise on both skeletal muscle and systemic oxidative stress in previously sedentary obese men. **Nutrition & diabetes**, 2013; 3(9):88.

SANYAL, S. N.; ONO, K. Derangement of autonomic nerve control in rat with right ventricular failure. **Patophysiology**, 2002; 8:197-203.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, 2000; 130:2073-2085.

SHANNON, R.; CHAUDHRY, M. Effect of alpha1-adrenergic receptors in cardiac pathophysiology. **American Heart Journal**, 2006; 152:842-850.

SCHERMULY, R. T. et al. Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2004; 169:39-45.

SHUJAAT, A. et al. Pulmonary hypertension and chronic cor pulmonale in COPD. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, 2007; 2(3):273-282.

SHULMAN, L. L. et al. Platelet activation and fibrinopeptide formation in pulmonary hypertension. **Chest**, 1993; 104:1690-1693.

SIES, H. **Oxidative stress, oxidants and antioxidants**. New York: Academic Press, 1991.

SILVA, B. V. et al. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova**; 2009, 32:453-462.

SILVA, W. J. M. da; FERRARI, C. K. B. Mitochondrial metabolism, free radicals and aging. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, 2011; 14(3):441-451.

SIMONNEAU, G. et al. Clinical classification of pulmonary hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, 2004; 43(12):5-12.

SIMONNEAU, G. et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, 2013; 62(25): 34-41.

SINGAL, P. K. et al. Oxidative stress in congestive heart failure. **Current Cardiology Reports**, 2000; 2(3):206-211.

SIQUEIRA, R. et al. Influence of estrogen on pulmonary arterial hypertension: role of oxidative stress. **Cell Biochemistry and Function**, 2011; 29:543-548.

SOUZA, R. et al. Diretrizes brasileiras para o manejo da hipertensão pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 2005;31(2):1-31.

SOUZA-RABBBO, M. 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**, 2008; 35(8):944-948.

STRANG, K. T. et al. Beta-adrenergic receptor stimulation increases unloaded shortening velocity of skinned single ventricular myocytes from rats. **Circulation Research**, 1994; 74(3):542-549.

SUTENDRA, G. A metabolic remodeling in right ventricular hypertrophy is associated with decreased angiogenesis and a transition from a compensated to a decompensated state in pulmonary hypertension. **Journal of Molecular Medicine**, 2013; 91(11): 1315-1327.

TOKARNIA, C et al. Plantas experimentalmente tóxicas para bovinos, porém incerto se de interesse pecuário. In: **Plantas tóxicas do Brasil**. 2º ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. 240-242.

TSUTSUI, H. et al. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodeling. **Cardiovascular Research**, 2009; 81:449-456.

TSUTSUI, H. et al. Oxidative stress and heart failure. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, 2011; 301(6):2181-2190.

TRIPOSKIADIS et al. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. **Journal of the American College of Cardiology**, 2009; 54:1747–1762.

TUDER, R. M. et al. Development and pathology of pulmonary hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, 2009; 54(1):3-9.

URBONIENE, D. et al. Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, 2010; 299(3):401-412.

USUI, S. et al. Upregulated neurohumoral factors are associated with left ventricular remodeling and poor prognosis in rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. **Circulation Journal**, 2006; 70(9):1208-1215.

VAILLANCOURT, M. et al. Adaptation and remodelling of the pulmonary circulation in pulmonary hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, 2014; 31:407-415.

VAN CAMPEN, J. et al. The effects of beta-blocker therapy on systolic and diastolic function in pulmonary arterial hypertension: A randomized controlled trial. **European Respiratory Journal**, 2014; 44(58).

VANHOUTTE, P.M.; GAO, Y. Beta blockers, nitric oxide, and cardiovascular disease. **Current Opinion in Pharmacology**, 2013; 13(2):265-273.

VANZELLI, A. S. Associação de betabloqueadores e treinamento físico na insuficiência cardíaca de camundongos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2010; 95(3):373-380.

VASCONCELOS, S.M.L. 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**, 2007, 30:1323-1338.

VENTETUOLO, C. E.; KLINGER, J. R. WHO Group 1 pulmonary arterial hypertension: current and investigative therapies. **Progress in Cardiovascular Disease**, 2012; 55(2):89-103.

VICTOR, R. G.; MARK, A. L. The sympathetic nervous system in human hypertension. In: LARAGH, J. H.; BRENNER, B. M. **Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management**, 2<sup>o</sup> edição. New York: Raven Press, 1995.

VOEKEL, N. F. et al. Right ventricular function and failure. **Circulation**, 2006; 114: 1888-1891.

VONK-NOORDEGRAAF, A. et al. Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: Physiology and pathobiology. **Journal of the American College of Cardiology**, 2013; 62(25):22-33.

VYBIRAL, T. et al. Effect of low dose of scopolamine in heart rate variability in acute myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, 1993; 22:1320-1326.

ZIPES, D.P. et al. Heart-brain interactions in cardiac arrhythmias: role of the autonomic nervous system. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, 2008; 75:94-96.

WALLUKAT, G. et al. Functional and structural characterization of anti-beta1-adrenoceptor autoantibodies of spontaneously hypertensive rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2003; 252(1-2):67-75.

WEINSTEIN, A. A. et al. Effect of aerobic exercise training on fatigue and physical activity in patients with pulmonary arterial hypertension. **Respiratory Medicine**, 2013; 107:778-784.

WERCHAN, P. M. et al. Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **The American Journal of Physiology**, 1989; 256(5-2):1328-1336.

WERSTIUK, E. S.; LEE, R. M. Vascular beta-adrenoceptor function in hypertension and in ageing. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 2000; 78:433-452.

WILSON, D. W. et al. Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. **Microvascular Research**, 1989; 38(1):57-80.

WILSON, J.N. et al. Reactive oxygen species in acute respiratory distress syndrome. **Heart Lung**, 2001; 30:370-375.

YEE, S. B. et al. Synergistic hepatotoxicity from coexposure to bacterial endotoxin and the pyrrolizidine alkaloid monocrotalina. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2000; 173-185.

YILDIZ, P. Molecular mechanisms of pulmonary hypertension. **Clinica Chimica Acta**, 2009; 403(1-2):9-16.

YIN, F. C. et al. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. **The American Journal of Physiology**, 1982; 243(6):941-947.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, 1994; 74:139-162.